

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Diplomová práce

Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro analýzu vybraných antivirotik v HILIC a RP módu

Development of UHPLC-MS/MS method for analysis of selected antivirotics in HILIC and RP mode

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Luboš Fical

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Luboš Fical

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro analýzu vybraných antivirotik v HILIC a RP módu

Cílem této diplomové práce je vývoj a optimalizace metod pro analýzu vybraných antivirotik a zároveň srovnání vhodnosti módu RP a HILIC pro tuto aplikaci. Vybraná antivirotika jsou užívána v terapii HIV a hepatitidy B a/nebo C.

Analýzy proběhly s využitím systému ACQUITY UPLC I-Class PLUS s hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu. Nejprve byla optimalizována MS/MS metoda. Pro RP mód bylo testováno celkem 6 stacionárních fází (BEH Shield RP18, BEH Phenyl, BEH C18, CSH Fluoro-phenyl, CSH Phenyl-hexyl a CSH C18) a 4 fáze mobilní (acetonitril v gradientové eluci s vodnou složkou: kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný pH 3 a octan amonný pH 9). Podmínky separace byly nastaveny následovně: teplota 40 °C, průtok 0,3 mL/min, gradientová eluce od 5 % ACN do 98 % ACN do 5. minuty, s izokratickým krokem na konci analýzy. Pro mód HILIC bylo testováno 10 stacionárních fází (BEH Amide, BEH HILIC, Cortecs HILIC, Ascentis Express HILIC, Ascentis Express OH5, Synchronis HILIC, Kinetex HILIC, Luna HILIC, Luna Omega SUGAR a Zorbax HILIC plus) a 4 fáze mobilní (acetonitril v gradientové eluci s vodnou složkou: kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný pH 3 a octan amonný pH 6). Podmínky separace byly nastaveny následovně: teplota 40 °C, průtok 0,3 mL/min, gradientová eluce od 98 % ACN do 50 % ACN do 5. minuty, s izokratickým krokem na konci analýzy. Byla vybrána stacionární fáze a optimalizováno složení mobilní fáze, průtoková rychlost a složení rozpouštědla vzorku. Pro obě metody byly nastaveny podmínky pro dosažení co nejvyšší citlivosti a selektivity. Pro RP byla nejvhodnější kolona BEH Shield RP18 a mobilní fáze 10 mM kyselina mravenčí s ACN v gradientové eluci. Pro HILIC byla vybrána Ascentis Express HILIC a jako mobilní fáze 25 mM mravenčan amonný pH 3 opět s ACN v gradientové eluci. Pro zajištění vhodného tvaru píku tenofoviru byl nutný přídavek 0,1 % kyseliny medronové do mobilní fáze v případě HILIC i RP. Porovnáním kalibračních křivek v obou módech byla zjištěna vyšší citlivosti pro 19 analytů v módu HILIC, a pro 5 analytů (efavirenz, lopinavir, simeprevir, tenofovir a tenofovir monoester) v módu RP.

Byla vyvinuta a optimalizována μ -SPE-PT metoda pro extrakci antivirotik z biologického materiálu, kterým bylo Hanksovo vyvážené solné (HBS) médium pH 6,5 a 7,4. Optimalizována byla chemie i množství sorbentu, složení promývacího a elučního činidla. Jako nejvhodnější sorbent se ukázala kombinace 2 vrstev měniče aniontů a 2 vrstev C18. Optimalizované promývací činidlo byl 5 mM amoniak ve vodě a elučním činidlem byla 25 mM kyselina mravenčí v 90 % ACN. Do metody byl následně pro zvýšení citlivosti zařazen krok odpaření elučního činidla a rekonstituce vzorku rozpouštědlem optimalizovaným pro danou metodu, HILIC i RP. Vyvinutá mikroextrakční metoda byla následně ověřena validací v obou módech, RP-UHPLC-MS/MS i HILIC-UHPLC-MS/MS.

Klíčová slova: antivirotika; UHPLC-MS/MS; RP; HILIC; vývoj metody; extrakce; optimalizace

Poděkování: Práce vznikla za podpory grantového projektu GA UK 1788218 a projektu EFSA-CDN (reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) spolufinancovaného z EFRR.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Luboš Fical

Supervisor: Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Development of UHPLC-MS/MS method for analysis of selected antivirals in HILIC and RP mode

The goal of this diploma thesis is development and optimization of methods for analysis of selected antivirals and comparison of suitability of RP and HILIC modes for this application. Targeted antivirals are used in treatment of HIV and hepatitis B and/or C.

LC analyses were carried out on the ACQUITY UPLC I-Class PLUS system with triple quadrupole MS detector. Initially MS/MS method was optimized. In RP mode total of 6 stationary phases (BEH Shield RP18, BEH Phenyl, BEH C18, CSH Fluoro-phenyl, CSH Phenyl-hexyl, and CSH C18) and 4 mobile phases (ACN in gradient elution with aqueous component: formic acid, acetic acid, ammonium formate pH 3, ammonium acetate pH 9) were tested. Separation conditions were as follow: temperature 40°C, flow rate 0.3 mL/min, gradient elution from 5 % ACN to 98 % ACN within 5 minutes with isocratic step at the end of analysis. In HILIC mode 10 stationary phases (BEH Amide, BEH HILIC, Cortecs HILIC, Ascentis Express HILIC, Ascentis Express OH5, Synchronis HILIC, Kinetex HILIC, Luna HILIC, Luna Omega SUGAR, and Zorbax HILIC plus) and 4 mobile phases (ACN in gradient elution with aqueous component: formic acid, acetic acid, ammonium formate pH 3, ammonium acetate pH 6) were examined. Separation conditions were as follow: temperature 40°C, flow 0.3 mL/min, gradient elution from 98 % ACN to 50 % ACN within 5 minutes with isocratic step at the end of analysis. In both cases most suitable stationary and mobile phase were selected, composition of sample injection solvent, and flow rate were optimized. Conditions for both methods were optimized in order to achieve the best sensitivity and selectivity. BEH Shield RP18 stationary phase was most suitable in RP mode using 10 mM formic acid with ACN in gradient elution as the mobile phase. In HILIC Ascentis Express HILIC and 25 mM ammonium formate pH 3 with ACN in gradient elution were selected. In order to assure appropriate peak shape of tenofovir addition of 0.1 % methanoic acid in mobile phase was necessary in HILIC and RP. By comparing calibration curves in both modes higher sensitivity for 19 analytes in HILIC and for 5 analytes (efavirenz, lopinavir, simeprevir, tenofovir and tenofovir monoester) in RP mode were found, respectively.

The μ -SPE-PT method for extraction of antivirals from biological material (Hanks balanced salt (HBS) medium pH 7.4 and 6.5) was developed and optimized. Chemistry and amount of sorbent, composition of washing, and elution solvent were optimized. Combination of 2 layers of anion exchange sorbent and 2 layers of C18 were selected as most suitable sorbent. Optimized washing solvent was 5 mM ammonia in water and elution solvent was 25 mM formic acid in 90 % ACN. In order to achieve higher sensitivity evaporation step and reconstitution in optimized solvent for both HILIC and RP were introduced. Developed microextraction method was verified by validation in both modes, RP-UHPLC-MS/MS and HILIC-UHPLC-MS/MS.

Key words: Antivirals; UHPLC-MS/MS; RP; HILIC; method development; extraction; optimization

Acknowledgements: The study was supported by grant project GA UK 1788218 and project EFSA-CDN (reg. no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by EFRR.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 10. 5. 2020

Luboš Fical

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a velmi cenné rady poskytnuté při zpracování této práce. Dále bych rád poděkoval kolektivu Katedry analytické chemie za vstřícné jednání a poskytnuté rady. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

Abstrakt	2
Abstract	3
Obsah	6
Seznam zkratk	8
1. Úvod	11
2. Cíl a popis zadání práce	12
3. Teoretická část	13
3.1. Kapalinová chromatografie	13
3.1.1. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	13
3.1.2. Reverzně fázový mód	14
3.1.3. Mód hydrofilní interakční chromatografie	15
3.2. Hmotnostní spektrometrie	19
3.2.1. Ionizační techniky	19
3.2.2. Hmotnostní analyzátory	20
3.3. Antivirotika	22
3.3.1. Přehled vlastností a struktur antivirotik analyzovaných v této práci	24
3.3.2. Přehled metod pro analýzu antivirotik	30
4. Experimentální část	33
4.1. Použité přístroje a pomůcky	33
4.2. Použité chemikálie	33
4.3. Příprava roztoků	35
4.3.1. Zásobní roztoky standardních látek	35
4.3.2. Pracovní roztoky	35
4.3.3. Mobilní fáze	35
4.3.4. HBS médium pro extrakce	36
4.4. Vývoj metody UHPLC-MS/MS na reverzních fázích	37
4.4.1. Nastavení LC metody na reverzních fázích	37
4.4.2. Optimalizace MS metody	37
4.4.3. Volba stacionární fáze v RP	38
4.4.4. Optimalizace složení mobilní fáze a průtokové rychlosti v RP	38
4.4.5. Vliv rozpouštědla vzorku v RP	38
4.5. Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody	39
4.5.1. Nastavení LC metody v HILIC	39
4.5.2. Ověření optimalizace MS metody v HILIC	39

4.5.3.	Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze v HILIC	39
4.5.4.	Vliv rozpouštědla vzorku v HILIC	40
4.6.	Vývoj μ -SPE-PT metody	40
4.6.1.	Výběr sorbentu a optimalizace jeho množství	40
4.6.2.	Optimalizace složení elučního činidla	40
4.6.3.	Optimalizace složení promývacího činidla	41
4.6.4.	Odpaření a rekonstituce vzorku	41
4.6.5.	Extrakce z HBS média	41
4.7.	Validace metody na reverzních fázích	41
4.8.	Validace HILIC metody	42
4.9.	Srovnání citlivosti metody na reverzních fázích a HILIC metody	43
5.	Výsledky a diskuze	44
5.1.	Vývoj metody UHPLC-MS/MS na reverzních fázích	44
5.1.1.	Optimalizace MS metody	44
5.1.2.	Volba stacionární fáze v systému reverzních fází	49
5.1.3.	Optimalizace složení mobilní fáze a průtokové rychlosti v RP	52
5.1.4.	Vliv rozpouštědla vzorku v systému reverzních fází	56
5.1.5.	Souhrn optimalizovaných podmínek pro metodu na reverzních fázích	59
5.2.	Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody	61
5.2.1.	Ověření výsledků optimalizace MS metody v módu RP pro mód HILIC	61
5.2.2.	Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze v HILIC	62
5.2.3.	Optimalizace průtokové rychlosti a nastavení gradientové eluce v HILIC	67
5.2.4.	Vliv rozpouštědla v HILIC	69
5.2.5.	Souhrn optimalizovaných podmínek pro metodu v módu HILIC	70
5.3.	Vývoj μ -SPE-PT metody	72
5.3.1.	Výběr sorbentu a optimalizace jeho množství	72
5.3.2.	Optimalizace složení elučního činidla	74
5.3.3.	Optimalizace složení promývacího činidla	75
5.3.4.	Odpaření a rekonstituce vzorku	76
5.3.5.	Extrakce z HBS média	76
5.3.6.	Souhrn optimalizovaných podmínek pro μ -SPE-PT	77
5.4.	Validace metody na reverzních fázích	77
5.5.	Validace HILIC metody	81
5.6.	Srovnání RP a HILIC metody	83
6.	Závěr	87
7.	Seznam použité literatury	89

Seznam zkratek

ABA	Abakavir
ACN	Acetonitril
AIDS	Syndrom získané imunodeficiency
AmAc	Octan amonný
AmF	Mravenčan amonný
ATA	Atazanavir
AX	Měnič aniontů
BEH	Ethylenem zesíťené hybridy
BIC	Biktegravir
BOC	Boceprevir
CE	Kolizní energie
CMV	Cytomegalovirus
CSH	Povrchově nabitě hybridy
CV	Napětí na vstupním kuželu
CX	Měnič kationtů
ČR	Česká republika
DAC	Daclatasvir
DAD	Detektor diodového pole
DID	Didanosin
DLLME	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOR	Doravirin
EFA	Efavirenz
ESI	Ionizace elektrosprejem
EtOH	Ethanol
ETR	Etravirin
FA / HCOOH	Kyselina mravenčí
GLE	Glekaprevir
HAART	Vysoce aktivní antiretrovirová léčba

HBS médium	Hanksovo vyvážené solné médium
HBV	Virus hepatitidy B
HCV	Virus hepatitidy C
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HIV	Virus získané imunodeficiency člověka
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSV	Herpes simplex virus
IS	Vnitřní standard
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní detekcí
LED	Ledipasvir
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	Spodní limit kvantifikace
LOP	Lopinavir
MAR	Maravirok
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MONO	Tenofovir monoester
MS	Hmotnostní spektrometr
MW	Molekulová hmotnost
n/a	Nedostupné; z anglického not available
PGC	Porézní grafitový uhlík
PP	Proteinová precipitace
RIL	Rilpivirin
RIT	Ritonavir
RNA	Ribonukleová kyselina
RP	Chromatografie na reverzních fázích
RPM	Otáček/min
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SAQ	Saquinavir
SDB	Styrendivinylbenzen
SF	Stacionární fáze

SIM	Simeprevir
SOF	Sofosbuvir
SPE	Extrakce na tuhé fázi
SPE-PT	Extrakce na tuhé fázi za použití sorbentu plněného do špiček pipet
SRM	Záznam vybrané reakce
TDF	Tenofovir disoproxil
TEN	Tenofovir
TNA	Tenofovir alafenamid
TOF	Analyzátor doby letu
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	Horní limit kvantifikace
UV	Ultrafialová část světelného spektra
VEL	Velpatasvir
ZID	Zidovudin

1. Úvod

Kapalinová chromatografie je v současnosti standardně používanou separační metodou pro analýzu různě komplexních směsí látek. Rovněž i spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je dnes rutinní a díky technikám ionizace za atmosférického tlaku i jednoduše realizovatelné a komerčně dostupné. Oproti jiným metodám detekce poskytuje hmotnostní spektrometr řadu výhod, mezi které patří především vysoká citlivost, specifita, případně možnost identifikace dosud neznámých látek.

Nejčastěji využívaným módem v kapalinové chromatografii je mód reverzně fázový, který poskytuje velmi robustní, rychlé analýzy, a je zpravidla využíván jako mód první volby pro drtivou většinu aplikací. Zároveň je velmi dobře popsán vlastní proces a fyzikálně chemický základ separace v tomto módu a je tak možná predikce separace na základě fyzikálně chemických vlastností analytů. Avšak pro určité spektrum analytů, především hydrofilních, poskytuje velmi zajímavé výsledky, ortogonální selektivitu a vysokou citlivost ve spojení s hmotnostní spektrometrií v současnosti poměrně progresivní mód hydrofilní interakční chromatografie.

Proto se srovnáním těchto dvou chromatografických módů pro aplikaci v analýze antivirotek zabývala tato diplomová práce.

Analyty byly látky ze skupiny antivirotek účinné především v terapii hepatitidy B a infekcí virem HIV. Jedná se o látky moderní a v kontextu molekul užívaných pro farmaceutické účely i poměrně nové, avšak v terapii používané ve stále větší šíři.

Problematika metod pro analýzu antivirotek je velmi aktuální. Jedná se o nové látky a pro některé z nich je v literatuře popsáno jen velmi málo analytických metod. Vývoj nových analytických metod může usnadnit další studium látek této skupiny, případně doplnit portfolium již existujících metod o metody nové, které budou mít vyšší citlivost a vzhledem k použití módu hydrofilní interakční chromatografie jinou selektivitu v porovnání s metodami dostupnými v literatuře. Dosud dostupné metody se ve většině případů zabývají užším spektrem látek. Vývoj metody pro analýzu širokého spektra antivirotek látek tak může umožnit jednodušší stanovení antivirotek v kontextu kombinační terapie (HAART), její optimalizace a změn.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce je vyvinout a optimalizovat LC-MS/MS metodu pro analýzu vybraných antivirotik. Výsledky rutinních měření budou prakticky využity Katedrou farmakologie a toxikologie ve výzkumu zabývajícím se membránovými transporty. Jejich výzkum spočívá ve studiu inhibice membránových transportérů a následného studia propustnosti této bariéry pro vybraná léčiva ze skupiny antivirotik. Proto je velmi výhodné mít k dispozici rychlou a selektivní metodu umožňující stanovit široké spektrum analytů, aby bylo možno reflektovat změny designu biologického experimentu.

Cílem práce je citlivé a selektivní stanovení směsi 24 vybraných analytů ze skupiny antivirotik a jejich metabolitů ve vzorku biologického materiálu za použití hmotnostně spektrometrické detekce. Dalším z cílů bylo porovnání vhodnosti dvou chromatografických módů (reverzně fázového módu a módu hydrofilní interakční chromatografie) pro separaci antivirotik pomocí UHPLC-MS/MS. Vybraná antivirotika jsou analyty velmi rozličných fyzikálně chemických vlastností a chemické struktury, ale i analyty vlastnostmi a strukturou velice blízké. Proto byla jejich separace a současné stanovení velmi zajímavou výzvou.

V úvodu bylo kritické získání informací o analytech – jejich fyzikálně chemické vlastnosti, tedy logP, pKa a rozpustnost, a dále pak informace o jejich chemické struktuře.

Následovala optimalizace SRM přechodů a vlastní MS metody, pak volba stacionárních a optimalizace složení mobilních fází pro jednotlivé chromatografické módy. Testováno bylo 6 kolon pro RP (BEH Shield RP 18, BEH Phenyl, BEH C18, CSH Fluoro-phenyl, CSH Phenyl-hexyl, CSH C18). Pro nejlepší z nich byl následně proveden screening mobilních fází. V případě módu HILIC bylo testováno celkem 10 chromatografických kolon. Vzhledem k tomu, že volba mobilní fáze byla i dle literatury v módu HILIC náročnější, byly testovány čtyři základní vodné složky mobilní fáze (kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný pH 3 a octan amonný pH 6) v několika koncentracích pro všechny testované stacionární fáze (BEH Amide, BEH HILIC, Cortecs HILIC, Ascentis Express HILIC, Ascentis Express OH5, Synchronis HILIC, Kinetex HILIC, Luna HILIC, Luna Omega SUGAR, Zorbax HILIC plus). Mimo zmíněné parametry byl testován i vliv průtokové rychlosti a rozpouštědla vzorku.

Dále byly srovnány oba chromatografické módy. Ke srovnání bylo využito kalibračních křivek změřených za optimalizovaných podmínek obou metod pro jednotlivé analyty v módu RP i HILIC.

V dalším kroku byla vyvinuta a optimalizována metoda pro extrakci cílových látek z biologické matrice. V rámci vývoje metody bylo testováno celkem 6 sorbentů (C8, C18, SDB, PGC, AX a CX), byla testována různá eluční činidla (ACN s vodou v různém poměru s přísadkou kyseliny mravenčí) a rovněž i různá promývací činidla (ACN, MeOH a amoniak ve vodě).

V závěru byl proveden pokus o ověření validace metody pro konkrétní biologická média pomocí měření matricové kalibrační křivky a určení přesnosti a správnosti vyvinutých metod a stanovení matricových efektů.

3. Teoretická část

3.1. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je řazena mezi separační metody. Umožňuje dělení směsí látek na jednotlivé složky. Základní podstatou, která se uplatňuje v chromatografické analýze, je rozdělování látek mezi dvě fáze – fází stacionární a fází mobilní. Pro kapalinovou chromatografii je typické použití tuhé stacionární fáze, která je plněna do chromatografické kolony a kapalné mobilní fáze, která kolonou protéká. Pokud je složení protékající mobilní fáze po celou dobu analýzy stejné, jedná se o izokratickou eluci. V případě, kdy se složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění, se jedná o eluci gradientovou [1].

Během analýzy dochází k mnohonásobně opakovanému ustavování rovnováhy distribuce analyzovaných látek mezi stacionární a mobilní fází. Mezi hlavní principy dělení směsi patří adsorpce, rozdělování, iontová výměna, molekulová výluka a chirální interakce [2].

Kapalinový chromatograf jako takový se skládá ze zásobníků mobilní fáze, čerpadel, směšovače, odplyňovače, dávkovacího zařízení, analytické kolony, vhodného detektoru a počítače s chromatografickým softwarem pro ovládání přístroje, sběr dat a vyhodnocení výsledků analýzy. Při použití vhodného detektoru je možné určit kvalitativní složení směsi i stanovit obsah jednotlivých složek [1].

3.1.1. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Hlavním přístupem uplatňovaným v rámci zvýšení separační účinnosti je zmenšení částic stacionární fáze. Pro UHPLC se běžně používají částice menší než 2 μm . Zmenšením částic dochází ke zvýšení separační účinnosti kolony. Nevýhodou je ovšem další nárůst tlaku v systému [3,4].

V rámci UHPLC systému jsou díky použití malých částic nutná vysokotlaká čerpadla a další speciální úpravy systému. Jedním ze základních rysů přechodu od HPLC k UHPLC je minimalizace systémových objemů, které mají vliv na účinnost separace. Mimokolonový objem je tvořen více různými objemy, mezi které zahrnujeme objemy čerpadla, dávkovače vzorku a detektoru. V UHPLC systémech se mimokolonový objem pohybuje mezi 6 – 30 μL . Pro srovnání, u HPLC systémů je to 70 – 200 μL . Zmenšením systémových objemů je dosaženo i minimalizace zpoždění gradientu v případě gradientové eluce. Toto zpoždění je dáno objemem mezi směšovačem mobilní fáze a začátkem chromatografické kolony. Díky tomu se i při použití gradientové eluce vyskytuje na začátku analýzy izokratický krok. Tlak v HPLC systému se běžně pohybuje kolem 300 bar, zatímco v UHPLC systému jsou běžné tlaky kolem 1 000 bar i více. Jedním z nároků kladených na čerpadla je zajištění přesného průtoku mobilní fáze systémem. Běžné průtokové rychlosti se v UHPLC analýzách pohybují mezi 0,01 – 2 mL/min, případně i více. Dále je nutná dostatečná rychlost nástřiku vzorku, a především přesnost dávkování se zanedbatelným přenosem vzorku do další analýzy. Pro detektor je kritickým parametrem rychlost sběru dat, která by se neměla pohybovat pod 20 body/s. V případě použití optického detektoru (např.: UV, DAD) je nutná speciální optická cela, která zachová dostatečně dlouhou dráhu procházejícího paprsku. Zachování optické dráhy je docíleno odrazem paprsku od stěn cely [3–7].

Sorbenty pro UHPLC systémy jsou založené především na bázi silikagelu. Komerčně jsou dostupné i hybridní částice často připravené technologií zesítění ethylenovými můstky (BEH). Díky přítomnosti ethylenových můstků vynikají i dobrou chemickou stabilitou při vyšším pH.

Modifikací BEH byly získány povrchově nabitě hybridy (CSH). Povrchový náboj zlepšuje tvar píku pro shodně nabitý analyt při použití mobilní fáze s nízkou iontovou silou. Rovněž přináší další separační mechanismus, a to iontovou výměnu [8,9].

Zajímavou technologií je i technologie povrchově porézních částic s pevným jádrem, které tvoří zpravidla 25 – 36 % částice. Pokles retence oproti plně porézním částicím je u některých výrobců maximálně 15 %, kapacita kolony zůstává stejná a závisí spíše na objemu pórů povrchu částice než na síle porézní vrstvy. Jsou komerčně dostupné jak pro reverzně fázový mód – C8, C18 a fenyl, tak i pro HILIC [10,11].

3.1.2. Reverzně fázový mód

Pro reverzně fázový chromatografický mód je charakteristické použití hydrofobní stacionární fáze a hydrofilní fáze mobilní. Hlavním principem uplatňovaným v separaci je rozdělování na základě afinity k dané fázi. Pro separaci na reverzních fázích jsou typické především hydrofobní interakce, proto je důležité složením mobilní fáze a nastavením pH zajistit neionizovanou formu molekuly analytu. V případě, že je analytem slabá kyselina, je voleno pro analýzu kyselé pH, v případě, že analyzovaná látka má charakter zásady, je obvykle dosaženo vyšší retence při zásaditém pH. S rostoucím podílem organické složky v mobilní fázi se zvyšuje eluční síla, a tím urychluje vymytí látky z kolony. Rozpouštědla jsou dle své eluční síly řazena do elutropické řady rozpouštědel [2,4,12].

Stacionární fáze v RP jsou nejčastěji založené na bázi modifikovaného silikagelu. Skupinami navázanými na sorbentu jsou nejčastěji nepolární oktadecyl (C18), oktyl (C8), fenyl, pentafluorofenyl a trifluoropropyl, případně polární kyanopropyl (CN), aminopropyl a dioly. Pro retenci je zásadní míra navázání ligandu vyjadřovaná jako obsah vázaného uhlíku, kdy s rostoucím stupněm pokrytí roste i retence. Retence látek je ovlivněna délkou navázaného alkylu a obecně lze říct, že s rostoucí délkou alkylového řetězce se retence zvyšuje. Počet volných silanolových skupin rovněž velmi silně ovlivňuje tvar a symetrii chromatografických píků, a to zejména u bazických látek. Tuto skutečnost je možno ovlivnit další modifikací silikagelu. Prvním příkladem je endcapping, jedná se o navázání většinou trichlormethylsilanu na volné silanolové skupiny. Tím je snížen jejich počet a zároveň je omezeno chvostování bazických analytů. Druhým způsobem odstínění volných silanolových skupin je začlenění polární skupiny do řetězce modifikujícího sorbent. Třetí možností, jak odstínit volné silanoly, je sterické bránění. Tento způsob využívá objemných funkčních skupin, které zabírají přístup analytu k silanolové funkční skupině. U silikagelových kolon je důležité brát zřetel na jejich stabilitu v daném rozmezí pH. U klasických silikagelových kolon je rozmezí pH 2 – 8, při vyšším pH dochází k rozpuštění silikagelu [4,12–14].

Mezi další materiály používané pro výrobu stacionárních fází patří polymery, kombinace polymeru a silikagelu – hybridní stacionární fáze a oxidy kovů, například oxid zirkoničitý. Použití těchto materiálů zlepšuje vlastnosti sorbentu – jeho chemickou stabilitu a odolnost vůči vysokému tlaku používanému zejména při UHPLC analýzách. Vysoký tlak bývá problém zejména pro polymerní SF [4,12].

Mezi hybridní stacionární fáze se řadí například sorbenty firmy Waters označované jako BEH – ethylenem zesítené hybridy. Jedná se o nástupce methylenových hybridů. Dostupné jsou BEH v širokém spektru modifikací (od klasických C8, C18, přes fenylhexylové skupiny až po skupiny karbamoylové) a své použití nachází nejen v separaci malých molekul, ale rovněž v proteomice. Jejich velkou výhodou je stabilita, ať už chemická, teplotní, či mechanická, která je kritickým parametrem pro použití za podmínek UHPLC. BEH odolávají tlaku až 1 241 bar. Někteří

zástupci BEH jsou stabilní i při teplotě 80°C, avšak tento limit není paušální, liší se dle modifikace a použitého pH. Limity pH se zpravidla pohybují mezi 1 – 12. Nabízí tedy možnost analýzy prakticky v celém spektru pH. BEH kolony, které byly použity při vypracování této práce, jsou shrnuty v tabulce 1 [15].

Tabulka 1: Souhrn vlastností kolon BEH použitých v této práci [15].

Kolona	BEH Shield RP18	BEH Phenyl	BEH C18
Velikost pórů	130 Å	130 Å	130 Å
Specifický povrch	185 m ² /g	185 m ² /g	185 m ² /g
pH rozsah	2,0 – 11,0	1,0 – 12,0	1,0 – 12,0
Limitní teplota	Nízké pH	50°C	80°C
	Vysoké pH	45°C	60°C
Pokrytí uhlíkem	17 %	15 %	18 %
Ligand	polární skupina s navázaným C18	C6 fenyl	C18
Vazba ligandu	monofunkční	trifunkční	trifunkční
Endcapping	trimethylsilan	chráněno patentem	chráněno patentem
Limitní tlak	1 241 bar	1 241 bar	1 241 bar
Výrobce	Waters	Waters	Waters

Další skupinou stacionárních fází, které byly použity v této práci, byly sorbenty typu CSH. Jedná se o hybridní částice založené na technologii BEH. Jejich povrch je modifikován další funkční skupinou s nábojem, nejen navázaným ligandem. Díky použití technologie BEH vynikají sorbenty této skupiny vysokou stabilitou. Mezi další výhody patří symetričtější tvar píku pro bazické látky při použití kyselého pH. Za lepší tvar píku je odpovědný náboj, který se na povrchu částice vyskytuje – chromatografie je pak v tomto případě označována jako vícemodální, protože kombinuje více separačních mechanismů. CSH kolony použité v této práci jsou shrnuty v tabulce 2 [4,15].

Tabulka 2: Souhrn vlastností kolon CSH použitých v této práci [15].

Kolona	CSH Fluoro-Phenyl	CSH Phenyl-hexyl	CSH C18
Velikost pórů	130 Å	130 Å	130 Å
Specifický povrch	185 m ² /g	185 m ² /g	185 m ² /g
pH rozsah	1,0 – 8,0	1,0 – 11,0	1,0 – 11,0
Limitní teplota	Nízké pH	60°C	80°C
	Vysoké pH	45°C	45°C
Pokrytí uhlíkem	10 %	14 %	15 %
Ligand	propylfluorofenyl	Fenyl-hexyl	C18
Vazba ligandu	trifunkční	trifunkční	trifunkční
Endcapping	žádné	chráněno patentem	chráněno patentem
Limitní tlak	1 241 bar	1 241 bar	1 241 bar
Výrobce	Waters	Waters	Waters

Separace na reverzních fázích je velmi univerzální. Díky tomu je metodou první volby při vývoji a optimalizaci chromatografické metody. Je vhodná pro analýzu jednoduchých směsí i velmi komplexních vzorků typu extraktů z biologických matric – séra, moči. I přes rozvoj nových separačních módů je podíl jejího použití stále větší než 85 % [4].

3.1.3. Mód hydrofilní interakční chromatografie

Pro mód hydrofilní interakční chromatografie je typické použití hydrofilní stacionární a relativně hydrofobní fáze mobilní. Mobilní fáze pro mód HILIC je převážně organická a obsahuje většinou kolem 80 % organické složky – většinou acetonitrilu, běžně podíl 70 – 95 %, a minimálně 3 % vodné složky – vodného pufru. Vodná složka pak tvoří na stacionární fázi stagnantní vrstvu,

která umožňuje separaci mechanismem rozdělování a solvatuje funkční skupiny stacionární fáze. Hydrofilní interakční mód je velice vhodnou metodou pro analýzu velmi polárních analytů, které není možné uspokojivě analyzovat v systému reverzních fází kvůli nízké retenci. Je tedy ortogonální technikou k reverzně fázovému módu. Separační mechanismy uplatňované v retenci analytů jsou komplexní, a ne zcela prostudované. Patří mezi ně rozdělování, dále adsorpce, hydrofilní a hydrofobní interakce. K hydrofilním interakcím počítáme iontovou výměnu, elektrostatické interakce typu dipól-dipól a tvorbu vodíkových můstků. Hydrofobní interakce se ve větší míře zapojují do separace při vyšším obsahu vodné složky – nad 30 %. Retence se následně více blíží módu reverzních fází [4,9].

Vodná složka mobilní fáze má silný vliv na retenci, který je dán především pH a iontovou silou – koncentrací pufru. Vyšší pH vede k ionizaci volných silanolů, a tím ke zvýšení retence bazických molekul. Neutrální látky interagují se stacionární fází jinak, slabšími neelektrostatickými interakcemi. Pokud jsou silanolové skupiny stacionární fáze ionizované, ovlivňují separaci. U silných kyselin s rostoucím pH retence klesá v důsledku odpuzivých sil mezi záporně nabitou kyselinou a ionizovanými, záporně nabitými silanolovými skupinami sorbentu. Je důležité pamatovat na skutečnost, že po přidání 90 – 95 % ACN k vodnému pufru určitého pH dochází k ovlivnění aktuální kyselosti, či zásaditosti pufru a přesné pH není možné určit [9,16].

Vysoké koncentrace pufru, vysoká iontová síla MF snižuje iontové interakce mezi analytem a SF. Ionty z MF jsou více rozpustné ve vodné vrstvě MF, která solvatuje sorbent, než v organické složce MF. V důsledku toho se v této vrstvě vyskytují ve vyšší koncentraci a obsazují nabitě silanolové skupiny SF, čímž snižují jejich potenciál pro interakci s molekulami analytu. Stíněné silanolové skupiny mohou retenci ovlivnit pozitivně i negativně. Ke snížení retence dochází u silných bází v důsledku omezení iontových interakcí, naproti tomu kyseliny jsou v důsledku snížení repulze zadržovány v systému více [17].

Z výše uvedeného plyne, že složení mobilní fáze má kritický vliv na retenci a selektivitu, symetrii chromatografických píků a pořadí eluce. Krom acetonitrilu jsou okrajově používána i jiná organická rozpouštědla, například izopropylalkohol, ethanol, methanol, aceton. Avšak náhrada ACN zpravidla ústí v nedostatečnou retenci. Zmíněná rozpouštědla totiž ve větší míře obsazují aktivní místa uplatňující se v separaci. Jako přísady pro úpravu pH jsou nejčastěji využívány kyselina mravenčí a kyselina octová a jako pufrů jejich amonné soli [2,9].

Nevýhodou HILIC je čas nutný pro ekvilibraci kolony, který je velmi dlouhý – až 1 hodina. Čím silnější stagnantní vodnou vrstvu k sobě sorbent váže, tím delší je čas ekvilibrace. Závisí na typu SF, uchovávacím médiu, použité MF a jejím průtoku. Dlouhý čas ekvilibrace představuje problém především pro gradientovou eluci, kde se složení mobilní fáze během analýzy mění. Řešením je pouze částečná ekvilibrace a následně nástřik několika ekvilibračních blanků. Při změně mobilní fáze je doporučeno ekvilibrovat kolonu objemem mobilní fáze, který je roven padesátinásobku objemu kolony. Rovněž i při měření nové série vzorků je vhodné provést ekvilibraci dvacetinásobkem objemu kolony [9,16].

Stacionární fáze pro HILIC mohou být neutrální, kdy mezi analytem a SF nevznikají žádné elektrostatické interakce. Do této skupiny patří stacionární fáze modifikované dioly, amidy, kyano-skupinami a polyvinylalkoholy. Další skupinou jsou nabitě SF, které s analytem tvoří silné elektrostatické interakce. K nim se počítají sorbenty modifikované aminopropylem, imidazolem, triazolem a SF na bázi nederivatizovaného silikagelu, které často bývají sorbentem volby. Třetí a poslední skupinou jsou obojetné ionty označované jako zwitterionty. S analytem tvoří pouze slabé elektrostatické interakce. Do této skupiny jsou řazeny sorbenty modifikované

sulfobetainem a fosfocholinem. Zcela specifickou skupinou jsou cyklodextrinové SF, které se používají v chirálních separacích. Retence je závislá na funkčních skupinách analytu a hydrofilite stacionární fáze [9,18,19].

Při zpracování této práce byly použity zástupci sorbentů všech tří hlavních tříd. Mezi zástupci nemodifikovaných silikagelů to byly kolony výrobce Waters (BEH HILIC a Cortecs HILIC), Sigma-Aldrich (Ascentis Express HILIC), Phenomenex (Kinetex HILIC) a Agilent (Zorbax HILIC plus). Z modifikovaných silikagelů bylo použito zástupců portfolia Waters (BEH Amide), Sigma-Aldrich (Ascentis Express OH5) a Phenomenex (Luna HILIC a Luna Omega SUGAR), z poslední skupiny byla použita sulfobetainová kolona Synchronis HILIC od Thermo Fisher Scientific. Vlastní technologie částic se u použitých kolon různí. Byli použiti zástupci povrchově porézní částice Cortecs firmy Waters, analogické Fused-Core firmy Sigma-Aldrich a Kinetex Core-Shell firmy Phenomenex. Rovněž byli použiti i zástupci plně porézní silikagelové technologie, kam je možné zahrnout kolony Synchronis HILIC, kolony řady Luna, kolonu Zorbax HILIC plus a kolony řady BEH. Specifikace všech typů kolon jsou uvedeny v tabulce 3 [15,20,29–38,21,39,22–28].

Velkou výhodou módu HILIC je rovněž jeho kompatibilita s MS detekcí, především díky složení MF. Dosažení vyšší odezvy v porovnání s ortogonálními technikami je zapříčiněno použitím těkavých rozpouštědel – zejména ACN, které umožňují snazší přechod analytů do plynné fáze v iontovém zdroji, a tím snazší ionizaci. Zároveň nižší povrchové napětí rozpouštědel zvyšuje stabilitu elektrospreje. Další výhodou je přímá kompatibilita s přípravou vzorku – technikou SPE i LLE, kde je finálním rozpouštědlem zpravidla ACN [9,40].

Kritickým bodem vývoje HILIC metody je volba rozpouštědla pro vzorek. V tomto módu více než v jiných dochází k ovlivnění především tvaru píku a účinnosti separace. V ideálním případě je vhodné rozpustit vzorek v rozpouštědle složením blízkému mobilní fázi. Bohužel polární analyty mohou mít v ACN nedostatečnou rozpustnost. Používají se proto přídavky polárnějších látek, jako například MeOH, izopropylalkohol, případně voda. Pokud je použito jiné rozpouštědlo vzorku než ACN, případně MF, má jeho přídavek do směsi významný vliv na tvar píku. Ideálně by přídavek polární látky do rozpouštědla vzorku neměl tvořit více než 25 % rozpouštěcí směsi. Krom využití tohoto principu je možné zlepšit rozpustnost vzorku malým přídavkem – do 0,2 % kyseliny mravenčí nebo hydroxidu amonného. Tento přídavek má často pozitivní vliv i na odezvu MS detektoru [9].

Dalším parametrem, který by neměl být během optimalizace HILIC metody zcela přehlížen, jsou oplachové roztoky pro jehlu dávkovače. Pokud dojde ke kontaktu roztoku vzorku s oplachovou směsí, může docházet ke stejným problémům jako v případě volby rozpouštědla vzorku. Je tedy vhodné, aby oplachová směs měla podobné složení jako MF při izokratické eluci nebo jako MF na začátku gradientové eluce [9].

Tabulka 3: Souhrn vlastností kolon pro HILIC použitých v této práci.

Kolona		BEH HILIC	Cortecs HILIC	Ascentis Express HILIC	Kinetex HILIC	Zorbax HILIC plus
Velikost pórů		130 Å	90 Å	90 Å	100 Å	95 Å
Specifický povrch		185 m ² /g	n/a	135 m ² /g	200 m ² /g	160 m ² /g
pH rozsah		1,0 – 9,0	1,0 – 5,0	1,0 / (2,0) – 8,0	2,0 – 7,5	1,0 – 8,0
Limitní teplota	Nízké pH	60°C	45°C	60°C	60°C	40°C
	Vysoké pH	40°C	45°C	60°C	n/a	40°C
Pokrytí uhlíkem		0 %	0 %	n/a	0 %	n/a
Ligand		-	-	-	-	-
Vazba ligandu		-	-	-	-	n/a
Endcapping		ne	ne	ne	ne	n/a
Limitní tlak		1 241 bar	1 241 bar	600 bar	1 000 bar	400 bar
Výrobce		Waters	Waters	Sigma-Aldrich	Phenomenex	Agilent
Zdroje		[15]	[20]	[21,23]	[29,30]	[33–35]
Kolona		BEH Amide	Ascentis Express OH5	Luna HILIC	Luna Omega SUGAR	Syncronis HILIC
Velikost pórů		130 Å	90 Å	200 Å	100 Å	100 Å
Specifický povrch		185 m ² /g	135 m ² /g	200 m ² /g	260 m ² /g	320 m ² /g
pH rozsah		2,0 – 11,0	1,0 / (2,0) – 8,0 (9,0)	1,5 – 8,0	2,0 – 7,0	2,0 – 8,0
Limitní teplota	Nízké pH	90°C	60°C	60°C	60°C	60°C
	Vysoké pH	90°C	60°C	n/a	n/a	60°C
Pokrytí uhlíkem		12 %	n/a	5,70 %	< 2 %	5 %
Ligand		amid	5 hydroxylových skupin	diol	kombinovaný amid/amin	sulfobetain
Vazba ligandu		trifunkční	chráněno patentem	n/a	n/a	monofunkční
Endcapping		ne	ne	n/a	polární	ne
Limitní tlak		1 241 bar	600 bar	345 bar	345 bar	1 250 bar
Výrobce		Waters	Sigma-Aldrich	Phenomenex	Phenomenex	Thermo Fisher Scientific
Zdroje		[15]	[21,22]	[31,32]	[31]	[24–28]

3.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je velice citlivou a selektivní analytickou metodou. Podává informaci o molekulové hmotnosti, o zastoupení prvků a jejich jednotlivých izotopů ve spektru látky. Principem je převedení analyzovaných molekul na ionty a jejich následné rozlišení dle poměru hmotnosti a náboje (m/z) [41].

Spojení hmotnostní spektrometrie se separační technikou s sebou přináší mnoho výhod. Díky selektivitě hmotnostní detekce není v některých případech nutná kompletní separace analytů až na základní linii. Separační technika umožňuje odstranění interference z matrice a zlepšuje tak kvalitu spektrálních dat. Rovněž pomáhá omezit vliv matricových efektů, které mohou být pro analytickou metodu značným problémem. Existují přístupy a techniky, jak matricové efekty kvantifikovat, ověřit jejich přítomnost a minimalizovat jejich vliv. S výhodou je možné také provádět velmi spolehlivou kvantifikaci díky vnitřním standardům značeným stabilními izotopy [4].

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí přináší i mnohá specifika týkající se především složení mobilní fáze. Musí obsahovat pouze látky těkavé, u kterých nehrozí riziko krystalizace v iontovém zdroji. Pro ionizaci je rovněž důležité, aby koncentrace přidaných aditiv nebyla příliš vysoká, protože může docházet k potlačení signálu analytu [42].

Přístrojové vybavení hmotnostního spektrometru se skládá ze tří částí. První z nich je iontový zdroj, který slouží k ionizaci analytu a převedení do plynné fáze. Ionty následně putují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou za vysokého vakua analyzovány – rozděleny na základě různých fyzikálních principů dle poměru m/z . Po rozdělení v analyzátoru ionty dopadají na detektor. Celý systém je řízen počítačem. Mimo těchto hlavních součástí hmotnostní spektrometr zahrnuje iontovou optiku, která slouží k urychlení a zaostření iontů a vakuový systém. Vakuový systém tvoří rotační olejové pumpy, které udržují primární vakuum a turbomolekulární pumpy, které zajišťují finální vakuum pro práci MS systému [4,43].

3.2.1. Ionizační techniky

V současnosti existuje široké množství ionizačních technik použitelných pro převedení neutrálních částic analytu na iont. V zásadě je možné je rozdělit na ionizační techniky měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky se ve většině případů vyznačují nižší fragmentací v porovnání s tvrdými, přítomností protonované nebo deprotonované molekuly a neposkytují na všech typech přístrojů paušálně identická spektra. Mezi měkké ionizační techniky je řazena ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Oproti tomu tvrdé ionizační techniky, kam patří například elektronová ionizace, se vyznačují tvorbou radikálkationu. Při použití tvrdé ionizační techniky dochází k velice rozsáhlé fragmentaci. Výhodou je existence knihoven spekter usnadňujících interpretaci naměřených dat. Tvrdé ionizační techniky se používají ve spojení s plynovou chromatografií [4].

K ionizaci elektrosprejem dochází při vložení napětí na kapiláru, kterou je vzorek zaváděn do iontového zdroje. Používané napětí je v rozmezí 3 – 6 kV. Vložené napětí vytvoří na povrchu kapaliny proudící z kapiláry náboj. Proud kapaliny se následně na vrcholu kužele rozpadne na vysoce nabitě kapky a vzniká sprej. Velikost napětí, které je nutné použít, aby došlo ke vzniku spreje, je silně závislé na složení přiváděné kapaliny – na mobilní fázi. Krom uvolnění iontů během Coulombické exploze, dochází k jejich desorpci z povrchu kapky i při procesu odpařování rozpouštědla. To znamená, že aby došlo k ionizaci touto cestou, musí se molekula

analytu dostat k povrchu. Zároveň to znamená, že pro molekuly, které jsou schopny se hromadit na povrchu kapky poskytne ESI vyšší citlivost. Prakticky je tedy nutné vždy brát tento fenomén během analýzy v potaz, protože může mít za následek potlačení signálu sledovaného analytu, a tím snížení citlivosti metody [44,45].

Velkou výhodou elektrospreje je rovněž jeho schopnost poskytovat vícenásobně nabité ionty. Vznik vícenásobně nabitých iontů umožňuje analýzu látek vysoké molekulové hmotnosti na analyzátoch, které by pro jejich rozdělení neměly dostatečný hmotnostní rozsah. Podmínkou vzniku vícenásobně nabitého iontu je přítomnost ionizovatelných funkčních skupin. Přítomnost těchto skupin je typická především pro proteiny a ESI je tím pádem ionizací volby v proteomických aplikacích [44].

3.2.2. Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory slouží k rozdělení iontů dle poměru m/z a zároveň k urychlení a zaostření iontů na detektor. Prakticky využívají různých fyzikálních principů pro oddělení iontů různého poměru m/z . Prvním z principů je zakřivení dráhy letu iontu v magnetickém, či elektrickém poli, nebo v jejich kombinaci. Tohoto principu využívá magnetický sektor. Dále je možno využít různé stability oscilací v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí. Tohoto principu využívá kvadrupól, lineární iontová past a sférická iontová past. Na principu různé doby letu iontů pracuje analyzátor doby letu. Čtvrtým principem je různá absorpce energie při cykloidálním pohybu v kombinaci magnetického a elektrického pole. Tento způsob rozdělení iontů je typický pro iontovou cyklotronovou rezonanci. Posledním uváděným způsobem rozdělení iontů různého m/z je na základě různé frekvence harmonických oscilací. Tohoto principu využívá orbitální past [4].

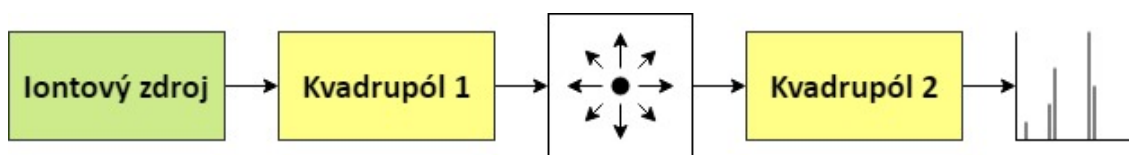
V případě zapojení tří kvadrupólů za sebe do tandemu je prostřední využit jako kolizní cela nebo je nahrazen jiným typem kolizní cely. Zbylé dva kvadrupóly slouží jako vlastní analyzátory. Kolizní cela umožňuje fragmentaci iontů přicházejících z prvního kvadrupólu a následuje jejich rozlišení podle m/z v kvadrupólu druhém. K fragmentaci dochází v důsledku zavedení inertního plynu, se kterým se ionty analytu sráží a zavedením kolizní energie. Plyn může být i reaktivní, čímž je přidán další mechanismus fragmentace pomocí iontově molekulárních reakcí [44].

Pro hmotnostní analyzátor jsou důležitými parametry hmotnostní rozsah – maximální a minimální možná měřitelná hodnota m/z , rozlišení – stejně jako v chromatografii se jedná o schopnost odlišit dva sousední blízké signály, správnost určení hmoty, lineární dynamický rozsah, rychlost sběru dat a vlastní citlivost [4].

Především rychlost sběru dat je ve spojení s UHPLC kritickým parametrem. Pro získání chromatografického píku typicky Gaussovského tvaru je třeba určitý počet bodů – naměřených spekter. Potřebný počet bodů je obvykle 12–15, pokud jich je změřeno méně, dochází k deformaci tvaru píku [41].

Analyzátory mohou poskytovat různé typy záznamů v závislosti na nastavení, které jsou shrnuty v obrázku 1. V zásadě je možné skenovat určitý rozsah m/z v celém průběhu chromatogramu, tento záznam je nazýván celkovým iontovým proudem, z něhož je možné získat záznam pro pouze jeden poměr m/z , ten je pak nazýván rekonstruovaným iontovým proudem. Z chromatogramů měřených ve skenovacím módu je možné odečítat kvalitativní informaci o analytu [42].

Obrázek 1: Schéma nastavení jednotlivých kvadrupólů a kolizní cely při hmotnostní detekci [42].



	MS1	Kolizní cely	MS2	Typ skenu
MS sken	skenuje	-	-	kvalitativní
Záznam vybraného iontu	fixní m/z	-	-	kvantitativní
Sken produktových iontů	fixní m/z	+	skenuje	kvalitativní
SRM	fixní m/z	+	fixní m/z	kvantitativní
Sken prekurzorových iontů	skenuje	+	fixní m/z	kvalitativní
Sken neutrálních ztrát	skenuje	+	skenuje	kvalitativní (kvantitativní)

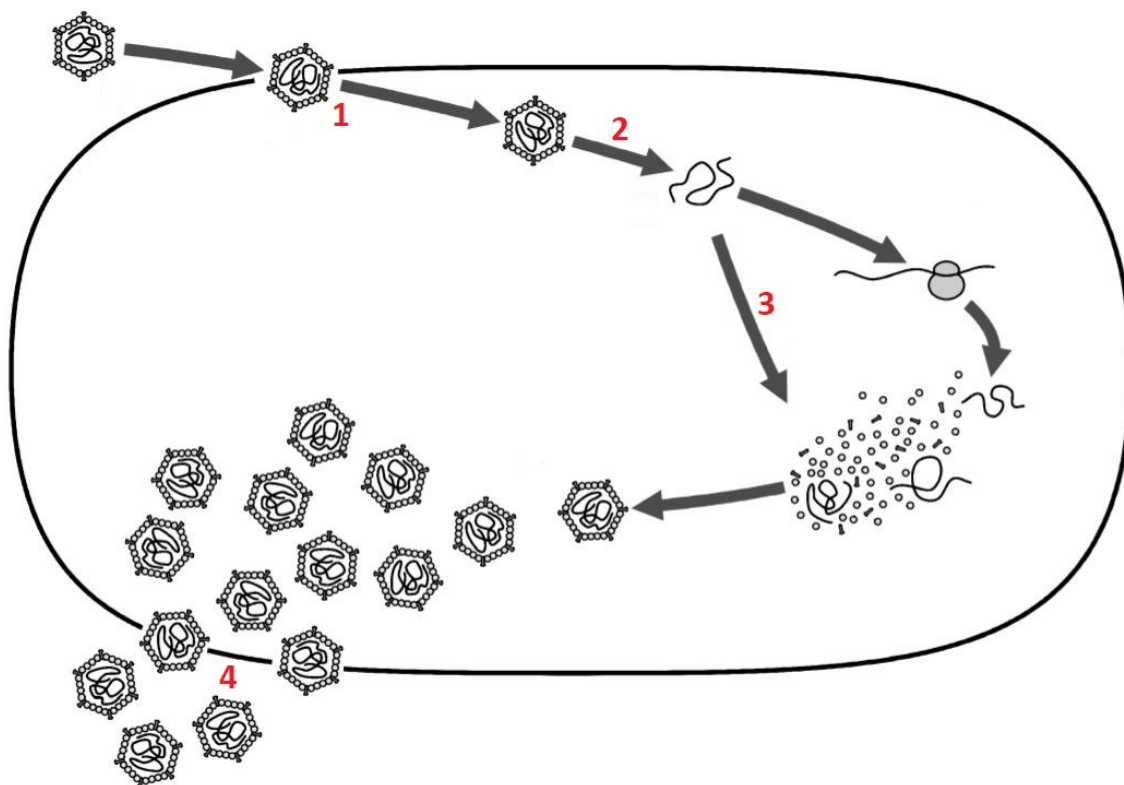
V bioanalytických aplikacích je spojení hmotnostní spektrometrie se separační metodou kapalinové chromatografie velmi výhodné. Chromatografie umožňuje analýzu chirálních a izobarických látek, které není možné oddělit a analyzovat s použitím MS. Zároveň odděluje látky, které by mohly interferovat s cílovými ionty v získaném spektru (interference s adukty, fragmenty,...). Tímto způsobem je tedy dosaženo zlepšení kvality spektrálních dat a minimalizace efektů matrice – potlačení, či zvýšení signálu. Pro eliminaci matricových efektů je rovněž kritický krok úpravy vzorku. Jeho cílem je v maximální možné míře eliminovat interference z biologické matrice. Techniky, které jsou v bioanalýze za tímto účelem používány, jsou: extrakce na tuhé fázi (SPE), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), proteinová precipitace (PP) a pro vzorky mimo krve a plasmy i technika „dilute and shoot“, která spočívá pouze v dostatečném naředění vzorku před analýzou a je tedy metodou velmi rychlou a jednoduchou na provedení. Pro vlastní ověření funkčnosti metody je po jejím vývoji nutná validace. V rámci validace jsou ověřeny parametry správnosti a přesnosti, je sestavena kalibrační křivka a určen rozsah, ve kterém je metoda schopna kvantifikovat analyty ve vzorku. V rámci validace jsou rovněž hodnoceny výše popsané matricové efekty. Validován je vždy přesně kompletní postup, který má být v rámci metody rutinně používán [4,42,46,47].

3.3. Antivirotika

Antivirotika jsou léčiva působící různými mechanismy proti virům a virovým infekcím. Mezi hlavní virové patogeny patří virus získané imunodeficiency – HIV, virus hepatitidy B a C – HBV a HCV, virus chřipky, papilomaviry, cytomegaloviry – CMV, varicella zoster virus – VZV a herpes simplex virus – HSV. Všechny zmíněné viry způsobují významné život ohrožující choroby, či choroby, které výrazně snižují kvalitu života. Celosvětově žije s HIV, HBV a/nebo HCV 350 milionů pacientů. Téměř 2,5 milionu z nich infekcím ročně podlehnou [48].

Viry jsou intracelulární parazité a pro své šíření a replikaci využívají struktury napadené hostitelské buňky, protože žádné vlastní nenesou. Je proto velmi náročné vyvíjet léčiva s přijatelnou toxicitou. Životní cyklus a místa účinku jednotlivých skupin těchto léčiv – antivirotik jsou patrné z obrázku 2. Hlavními mechanismy, které antivirotika využívají jsou inhibice vstupu viru do hostitelské buňky (číslo 1 na obrázku 2), inhibitory odpláštění viru (číslo 2 na obrázku 2), inhibitory syntézy DNA – transkriptázy, či DNA polymerázy (číslo 3 na obrázku 2), inhibitory virové integrázy, inhibitory proteázy a inhibitory neuraminidázy (číslo 4 na obrázku 2), které zabraňují viru opustit hostitelskou buňku [48–50].

Obrázek 2: Zjednodušené schéma životního cyklu viru se znázorněnými místy zásahu antivirotik [51].



Infekce HBV je významnou z hlediska epidemiologie především díky svému celosvětovému rozšíření. Jedná se o virus, který je přepisován a integrován do DNA hostitelské buňky, kde může přecházet do latentního stádia a vlastní hepatitida pak propuká až po určitém časovém období po infekci. Mezi hlavní rizika hepatitidy B patří fibrotizace a rozvoj cirhózy jater nebo zvýšené riziko hepatocelulárního karcinomu. Léčivem volby pro potlačení replikace HBV je tenofovir disoproxil fumarát, případně tenofovir alafenamid. Tenofovir působí mechanismem inhibice virové reverzní transkriptázy stejně jako adefovir dipivoxil. Reverzní transkriptázu inhibují rovněž analogy nukleosidů, kam je řazen například lamivudin, telbivudin a entecavir.

Tyto látky se používají především v dlouhodobé terapii nebo jako doplňky terapie v kombinacích s dalšími antiviroty [49,52].

Infekce HCV je významnou především díky vysoké mortalitě a morbiditě, bez léčení může velmi rychle přecházet v progresivní hepatocelulární poškození spojené s fibrotizací, či cirhózou. Infekce je rovněž spojena se zvýšeným rizikem hepatocelulárního karcinomu. Na rozdíl od HBV se HCV nezačleňuje do DNA hostitelské buňky. Nepřechází tedy v latentní stádium a je dobře léčitelná. HCV se vyskytuje v celkem šesti základních genotypech. Cílem terapie je nalézt takové antiviroty nebo jejich kombinaci, která účinně zasáhne proti všem genotypům. V současnosti se v terapii využívají především přímo působící antiviroty. Do této skupiny jsou řazeny dle mechanismu účinku látky, které inhibují iniciální proteázu, RNA dependentní polymerázu nebo její kofaktor. Všechny tři tyto enzymy jsou klíčové pro životní cyklus a replikaci viru. Jsou označovány i dle oblastí virového genomu, ze kterého pochází. Iniciální proteáza je přepisována z NS3/4A oblasti, RNA dependentní polymeráza je přepisována z NS5B oblasti a polymerázový kofaktor z oblasti NSSA. Hlavní látky používané v terapii HCV jsou sofosbuvir – inhibitor RNA dependentní polymerázy NS5B, velpatasvir – inhibitor kofaktoru NSSA a fixní trojkombinace sofosbuvir, velpatasvir, voxilaprevir – inhibitor NS3A. Dalším proteinem, na který antiviroty cílí, je protein přepisovaný z oblasti NS5A. Tento mechanismus účinku využívají ledipasvir, daclatasvir a ombitasvir. Inhibitory NS3/4A jsou děleny na dvě generace. Do první je řazen boceprevir, telaprevir a do druhé simeprevir. Dříve bylo preferovanou léčbou užití interferonu α v kombinaci s guanozinovým analogem ribavirinem [49,50,53].

Další skupinou antiviroty, jimiž se tato práce zabývá, jsou látky využívané v terapii HIV. Infekce HIV má za následek především progresi syndromu získané imunodeficiency označovaného jako AIDS. Jak z názvu plyne u infikovaných pacientů dochází k poškození imunitního systému a jsou tak ohroženi především druhotnými infekcemi. Pacienti, u kterých se rozvine chronický syndrom, přežívají zpravidla 8 – 10 let. HIV napadá především CD4 lymfocyty T. Viry HIV jsou rozdělovány na 2 základní skupiny. HIV-1 je rozšířen po celém světě, zatímco HIV-2 především v západní Africe [49].

V současnosti není dostupná léčba, která by byla schopna HIV infekci vyléčit trvale. V rámci terapie tak dochází především k potlačení replikace, množení viru, a tím oddálení rozvoje vlastního AIDS. Kombinace antiviroty užívaných v terapii jsou označovány jako HAART – vysoce aktivní antiretrovirová léčba. Tento přístup obvykle zahrnuje podávání dvou nukleosidových a jednoho nenukleosidového inhibitoru reverzní transkriptázy, či jednoho nebo dvou inhibitorů proteáz. Terapie je zahajována při poklesu CD4 lymfocytů pod $350/\text{mm}^3$, v případě těhotných žen, pacientů s nefropatií nebo infikovaných HBV je terapie zahajována okamžitě bez ohledu na počet CD4 buněk. Problémem, na který terapie naráží, je vznik rezistence v důsledku mutace viru. Pro předcházení a omezení vzniku rezistence se používá právě zmíněná kombinovaná léčba HAART [49,53].

Dle mechanismu účinku jsou tato antiviroty rozdělována na inhibitory vstupu viru do buňky, inhibitory reverzní transkriptázy a inhibitory proteázy. Inhibitory vstupu viru do buňky blokují specifický buněčný receptor CCR5 nebo glykoprotein gp-41 a zabraňují tak vazbě viru. U inhibitorů reverzní transkriptázy dochází k inhibici enzymu, který virus nese ve svém těle. Nukleosidové inhibitory musí být nejprve fosforylovány, v případě tenofoviru na difosfát, v případě všech ostatních na trifosfát, až poté jsou aktivní. I přes selektivitu k virové reverzní transkriptáze může u pacientů docházet k nežádoucím účinkům plynoucím z inhibice mitochondriální DNA polymerázy – anémie, myopatie, periferní neuropatie a pankreatitida. Inhibitory HIV proteázy zabraňují činnosti enzymu, který je zodpovědný za posttranslační

modifikace polyproteinů na proteiny strukturální – pro tvorbu virového obalu. Jejich nežádoucí účinky jsou spojeny především s cestou podání – dyspepsie, průjemy a po čase vymizí. Dlouhodobé nežádoucí účinky mohou zahrnovat zvýšené riziko vzniku metabolického syndromu. Posledním mechanismem účinku uplatňovaným u antivirotik je inhibice integrázy, která začleňuje virovou DNA do hostitelské a umožňuje tak přechod do latentního stádia. Do skupiny inhibitorů vstupu viru do buňky je zahrnován maravirok, enfuviritid a imunoglobuliny. Další skupinou jsou inhibitory reverzní transkriptázy, které jsou dále děleny na nukleosidové – lamivudin, zidovudin, didanosin, abakavir, adefovir disoproxil a telbivudin, nukleotidové – tenofovir disoproxil a tenofovir alafenamid a nenukleosidové – nevirapin, efavirenz, etravirin. Mezi inhibitory proteázy jsou řazeny indinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir a saquinavir. Do poslední skupiny inhibitorů integrázy jsou zahrnuty raltegravir, dolutegravir. Látek používaných v terapii infekcí HIV je velké množství a ani tento výčet není zcela vyčerpávající [49,50,53].

3.3.1. Přehled vlastností a struktur antivirotik analyzovaných v této práci

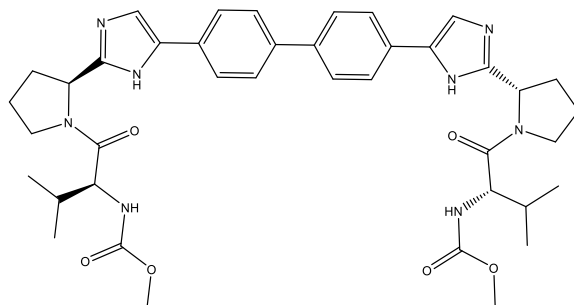
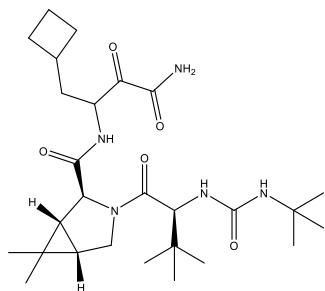
Analyty se velmi liší molekulovou hmotností a fyzikálně chemickými vlastnostmi shrnutými v tabulce 4. Většina analytů je rovněž acidobazicky aktivními látkami různé lipofility, díky tomu je jejich analýza v rámci jedné multimetody náročná. Na obrázcích 3 – 6 jsou zobrazeny struktury jednotlivých analytů ze skupiny antivirotik, jedná se o velmi různorodou skupinu látek, což může komplikovat jejich současnou analýzu a izolaci z biologického vzorku [54,55].

Tabulka 4: Souhrn fyzikálně chemických vlastností analytů [12,55–59].

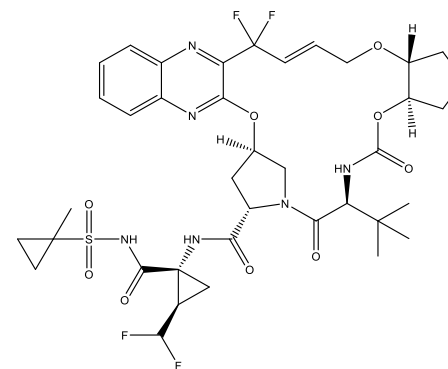
Analyt	Zkratka	Přesná hmotnost [Da]	MW [g/mol]	logP	Nejvíce kyselá pKa	Nejvíce bazická pKa	Acidita	Vzhled	Rozpustnost
Abakavir	ABA	286,1542	286,34	0,39	15,43	5,80	Bazický	Bílý nebo téměř bílý prášek	H ₂ O
Atazanavir	ATA	704,3897	704,87	4,54	11,92	4,42	Bazický	Bílý nebo světle žlutý hygroskopický prášek	EtOH 96%, slabě H ₂ O
Biktegravir	BIC	449,1199	449,39	1,36	9,81	-0,30	Kyselý	Bílý prášek	DMSO, ACN
Boceprevir	BOC	519,3421	519,69	1,70	12,44	-0,92	Neutrální	Bílý prášek	ACN, DMSO, MeOH
Daclatasvir	DAC	738,3853	738,89	5,11	12,47	5,40	Bazický	Bílý prášek	DMSO, MeOH
Didanosin	DID	236,0909	236,23	-0,35	10,94	2,76	Neutrální	Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek	DMSO, slabě H ₂ O
Doravirin	DOR	425,0503	425,75	2,23	9,66	n/a	Kyselý	Světle žlutý prášek	DMSO, MeOH
Efavirenz	EFA	315,0274	315,68	4,46	12,52	-1,49	Neutrální	Bílý prášek	ACN, MeOH
Etravirin	ETR	434,0491	435,29	5,54	10,99	3,49	Neutrální	Bílý prášek	DMSO
Glekaprevir	GLE	838,2983	838,87	3,95	3,74	-1,20	Kyselý	Bílý prášek	DMSO
Ledipasvir	LED	888,4134	889,02	6,71	11,22	5,32	Bazický	Bílý až béžový prášek	ACN, MeOH
Lopinavir	LOP	628,3625	628,81	4,69	13,39	-1,55	Neutrální	Bílý nebo žlutobílý slabě hygroskopický prášek	CH ₂ Cl ₂ , MeOH
Maravirok	MAR	513,3279	513,68	3,63	13,98	9,35	Bazický	Bílý prášek	ACN, EtOH
Rilpivirin	RIL	366,1593	366,43	5,47	11,43	4,44	Bazický	Světle žlutý prášek	DMSO
Ritonavir	RIT	720,3128	720,95	5,22	13,68	2,84	Neutrální	Bílý nebo téměř bílý prášek	CH ₂ Cl ₂ , MeOH
Saquinavir	SAQ	670,3843	670,86	3,16	13,61	8,47	Bazický	Bílý slabě hygroskopický prášek	Mírně MeOH
Simeprevir	SIM	749,2917	749,94	4,56	3,77	1,61	Kyselý	Bílý prášek	DMSO
Sofosbuvir	SOF	529,1625	529,46	1,28	9,70	n/a	Kyselý	Bílý prášek	DMSO, MeOH
Tenofovir	TEN	287,0783	287,22	-3,44	1,35	3,74	Kyselý	Bílý prášek	DMSO
Tenofovir alafenamid	TNA	476,1937	476,47	1,88	11,36	3,74	Bazický	Bílý prášek	DMSO, MeOH
Tenofovir disoproxil	TDF	519,1730	519,45	2,65	n/a	3,74	Bazický	Bílý prášek	DMSO
Tenofovir monoester	MONO	403,1257	403,33	-1,70	1,07	3,74	Kyselý	Bílý až béžový prášek	Slabě MeOH, H ₂ O
Velpatasvir	VEL	882,4065	883,02	5,11	11,71	5,36	Bazický	Bílý až světle žlutý prášek	DMSO
Zidovudin	ZID	267,0968	267,25	-0,30	4,22	n/a	Kyselý	Bílý nebo slabě nahnědlý prášek	EtOH, mírně H ₂ O

Glekaprevir

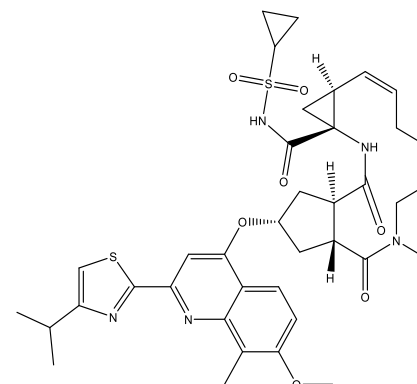
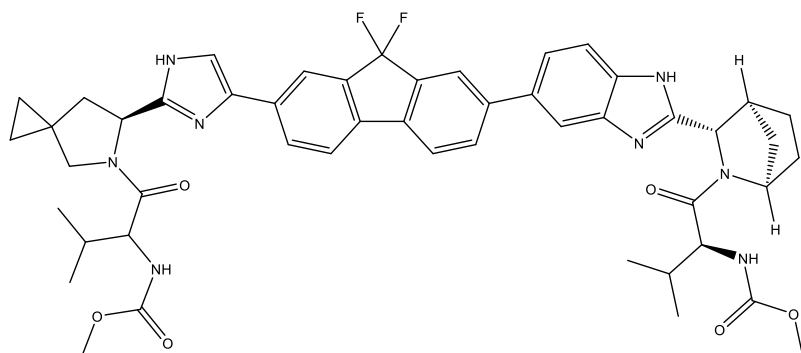
Daclatasvir



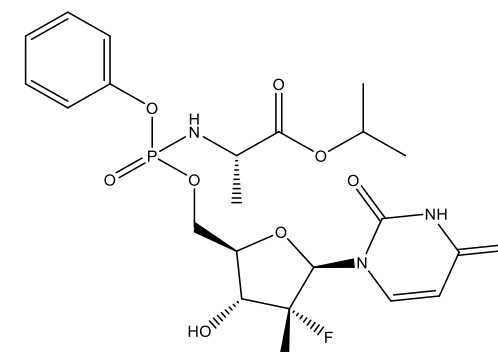
Glekaprevir



Simeprevir

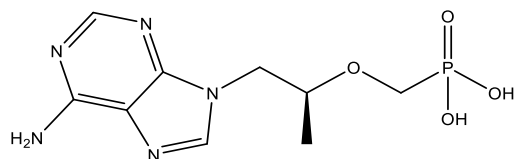


Sofosbuvir

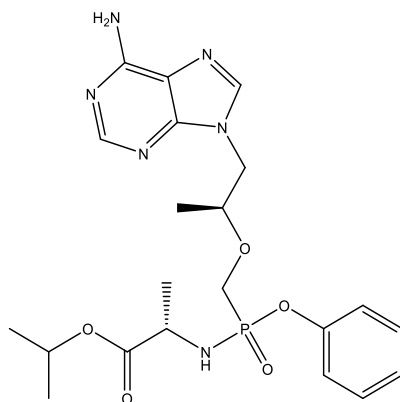


Obrázek 4: Struktury antivirotik používaných v terapii hepatitidy část 2 [54].

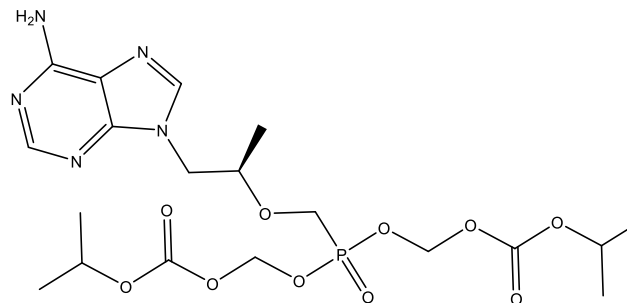
Tenofovir



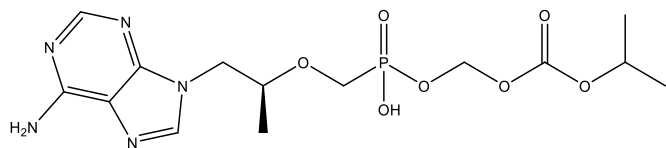
Tenofovir alafenamid



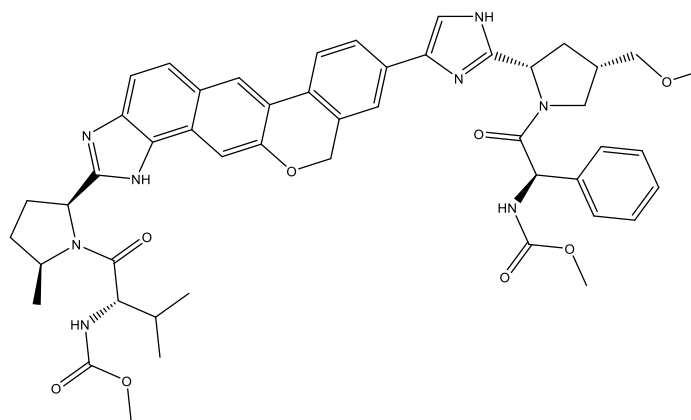
Tenofovir disoproxil



Tenofovir monoester

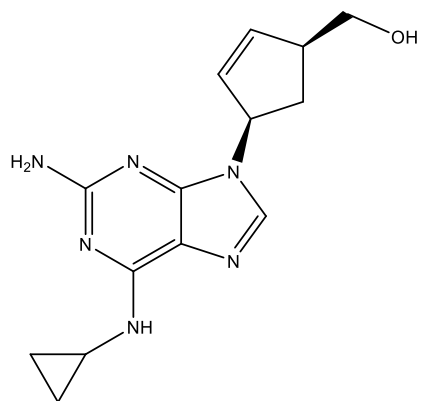


Velpatasvir

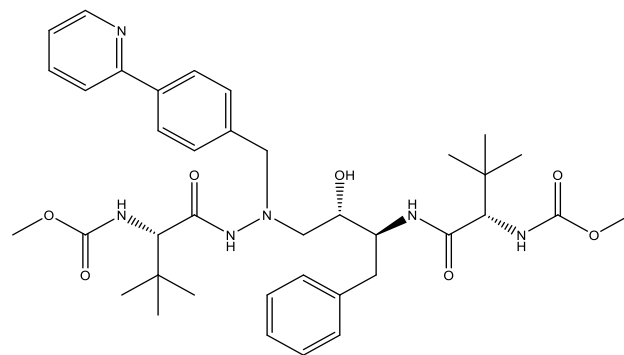


Obrázek 5: Struktury antivirotik používaných v terapii HIV část 1 [54].

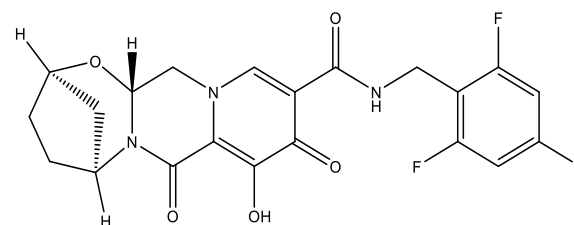
Abakavir



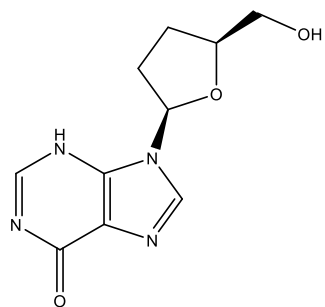
Atazanavir



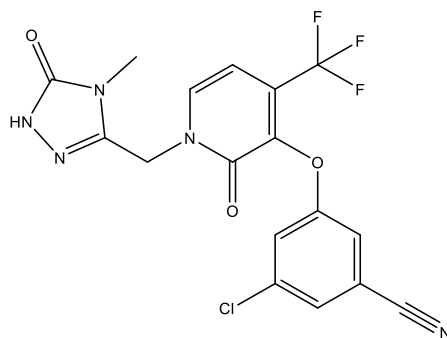
Biktegravir



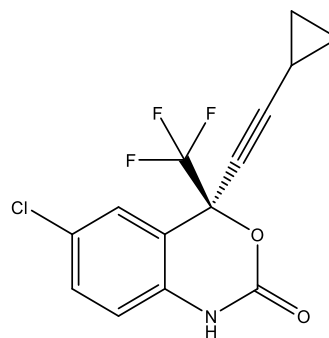
Didanosin



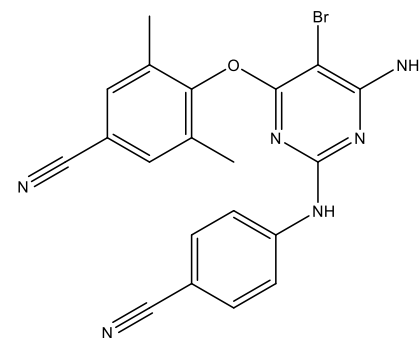
Doravirin



Efavirenz

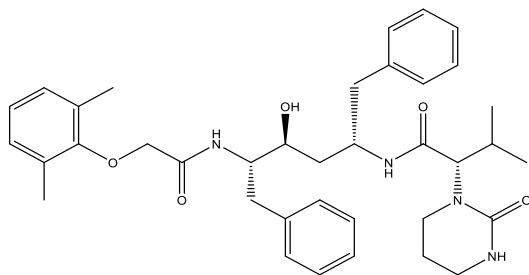


Etravirin

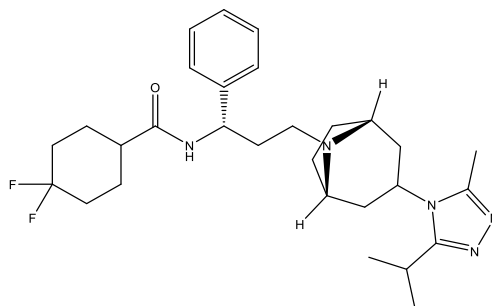


Obrázek 6: Struktury antivirotik používaných v terapii HIV část 2 [54].

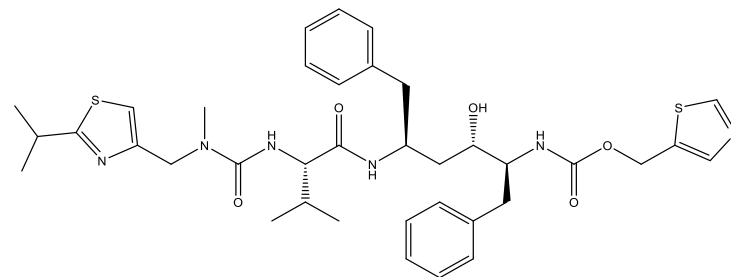
Lopinavir



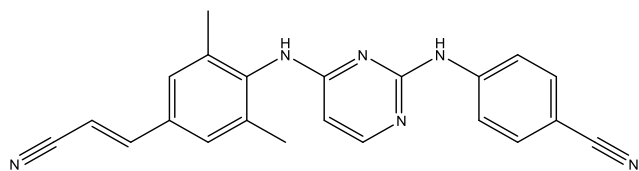
Maravirok



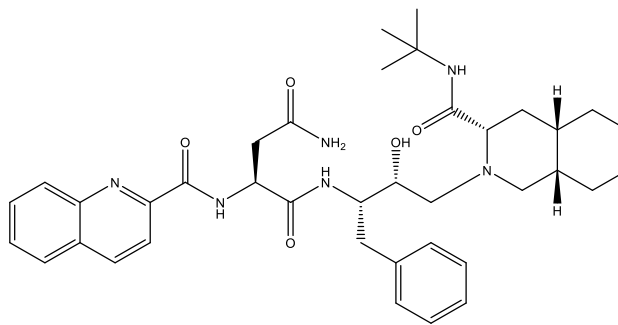
Ritonavir



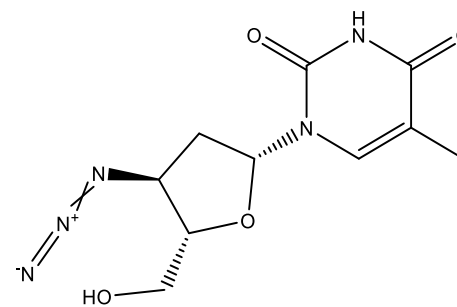
Rilpivirin



Saquinavir



Zidovudin



3.3.2. Přehled metod pro analýzu antivirotik

Přesné, správné a spolehlivé analytické metody pro stanovení antivirotik ve vzorcích biologických materiálů jsou nutné nejen během jejich vývoje a zkoušení, ale i při jejich běžném užívání. V rámci vývoje a zkoušení se jedná o farmakokinetické a metabolické studie, bioekvivalenční studie, klinické zkoušení, hodnocení lékových interakcí a chirální čistoty. Terapeutické monitorování je dostupné především pro látky pro léčbu HIV. Pro stanovení jsou v současné době metodou volby především LC-MS/MS metody. Biologické vzorky mají velmi komplexní charakter, je proto nutná úprava formou SPE, LLE, či proteinové precipitace. Bez úpravy je analýza nemožná, způsobuje poškození chromatografického systému – především kolony [48].

Právě proto jsou metodou volby analýzy biologických vzorků separační metody. Především chromatografické metody, které nabízí unikátní flexibilitu při vývoji a robustnost. Při spojení s hmotnostní spektrometrií jsou tyto výhody navíc rozšířeny o velmi dobrou selektivitu a citlivost. Mezi hlavní nevýhody patří vliv matrice vzorku na detekci. Matricové efekty mění odpověď MS a ústí v nízkou přesnost, správnost, selektivitu a citlivost. Pro redukci matricových efektů je kromě úpravy vzorku klíčová i vlastní separace, která umožňuje oddělit analyt od zbytků matrice, které nebyly odstraněny během extrakce [48].

V rámci bioanalýzy je zpravidla možné v biologických vzorcích stanovovat nejen antivirotika – proléčiva, ale i jejich metabolity – volná léčiva. V případě tenofoviru a adefoviru je tento přístup frekventovaný. V přípravě vzorku dominuje v analýzách především jednoduchá proteinová precipitace, někdy doplněná o krok LLE, dále je pak využíván přístup SPE. Samotná LLE je náročná na provedení, díky rozdílným vlastnostem analytů a není tedy zcela vhodnou metodou pro extrakci – jako příklad zmiňuji tenofovir. Proléčiva tenofoviru – disoproxil a alafenamid jsou lipofilní látky, zatímco volný tenofovir a jeho metabolity jsou látky velmi hydrofilní. Je tedy problém převést do extrakčního činidla všechny tyto analyty současně, protože tenofovir bude z velké části zůstat v hydrofilním prostředí vzorku. Dalším používaným přístupem ke zpracování vzorku je metoda „dilute and shoot“, kdy je vzorek pouze dostatečně naředěn a nastříkán na kolonu. Tento přístup ovšem není použitelný v případě plasmy. Nejčastěji analyzovanými biologickými materiály obsahujícími antivirotika jsou plasma, sérum a moč. Pro vlastní analýzu jsou nejvíce využívány módy RP a HILIC. Ze stacionárních fází pro HILIC se jedná o amidové SF a o SF založené na nemodifikovaném silikagelu, pro RP jsou využívány C18 modifikované SF, dále pak SF založené na fenylu – bifenyl, pentafluorofenyl a fenyl-hexyl. Pro detekci je užíván především MS/MS v módu SRM, který zajišťuje dostatečnou selektivitu a citlivost stanovení. Analyty ze skupiny antivirotik snadno tvoří protonované molekuly a je tedy výhodné použití ESI přednostně v pozitivním módu, tenofovir je rovněž možné analyzovat v módu negativním. Pro detekci pomocí UV detektoru, či PDA je nutná derivatizace. Analyty této skupiny jsou často analyzovány v rámci jedné analýzy, protože v léčebném programu jsou užívány v kombinacích – HAART. Tento přístup je ovšem často náročný díky rozdílům v lipofilitě sledovaných analytů [52].

V tabulce 5 jsou shrnuty nejnovější metody, které se zabývají analýzou antivirotik v biologickém materiálu. Jako biologické vzorky jednoznačně převažují vzorky plasmy. Metody jejich úpravy nejsou nijak specificky vyhraněné, používány jsou LLE, SPE i PP. Chromatografickým módem první volby je mód RP. Detekce pomocí MS/MS (s použitím SRM přechodů) převažuje nad detekcí pomocí UV. Dosažené LLOQ jsou většinou v řádech ng/mL [60–67].

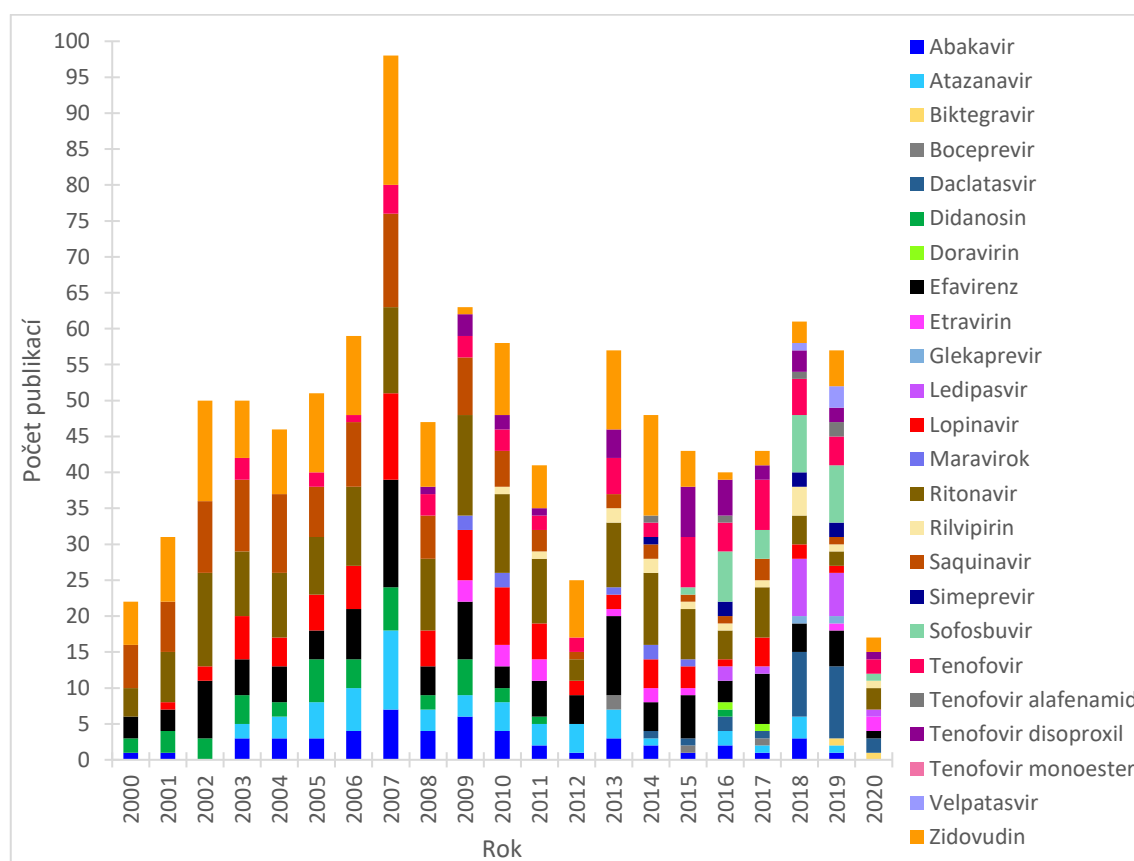
Tabulka 5: Přehled nejnovějších metod pro analýzu antivirotik.

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
Nevirapin, efavirenz, nelfinavir	Lidská plasma	SPE, DLLME	Eurospher 100-5 C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)	10 mM fosfátový pufr pH 5 ACN	HPLC-UV	0,1 – 0,25 ng/mL	[60] 2019
Efavirenz	Králičí plasma	PP (ACN)	ACQUITY CSH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm)	0,1 M FA ve vodě MeOH, ACN	UHPLC-UV	0,078 µg/mL	[61] 2019
Simeprevir, daclatasvir, sofosbuvir, GS-331007 + IS: simeprevir, daclatasvir, sofosbuvir, GS-331007	Lidská plasma	LLE	MassTox TDM MasterColumn A (2 x 50 mm)	0,1 % FA ve vodě 0,1 % FA v MeOH	LC-MS/MS	15,6 ng/mL	[62] 2019
Daclatasvir, elbasvir, grazoprevir, ledipasvir, simeprevir, sofosbuvir, velpatasvir + IS: sofosbuvir, daclatasvir, elbasvir, grazoprevir, ledipasvir, simerpevir, velpatasvir	Lidská plasma	PP	ACQUITY BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm)	10 mM AmF + 0,005 % FA ve vodě 10 mM AmF + 0,005 % FA v MeOH 10 mM AmF + 0,005 % FA v MeOH:ACN (10:90)	UPLC-MS/MS	3 – 25 µg/L	[63] 2019
Ribavirin, sofosbuvir, daclatasvir	Lidská plasma	LLE	Scharlau C18 (4,6 x 250, 5 µm)	Voda ACN	HPLC-UV-VIS	0,1 – 0,5 µg/mL	[64] 2019
Tenofovir alafenamid, tenofovir + IS: tenofovir alafenamid, tenofovir	Lidská plasma	PP (MeOH)	ACQUITY HSS T3 (2,1 x 100, 1,8 µm)	20 mM AmAc ve vodě 20 mM AmAc v MeOH	UHPLC-MS/MS	0,4 – 4 ng/mL	[65] 2019
Biktegravir + IS: dolutegravir	Lidská plasma	PP (ACN)	Kinetex EVO C18 (3,0 x 50 mm, 5 µm)	0,1 % FA ve vodě ACN	LC-MS/MS	1 ng/mL	[66] 2019
Tenofovir, emtricitabin, dolutegravir + IS: tenofovir, emtricitabin, dolutegravir	Krysí mozek	Lýza buňky, PP (MeOH), filtrace	XBridge C18 (2,1 x 50 mm, 5 µm)	Voda 0,1 % FA v ACN	LC-MS/MS	5 – 10 ng/mL	[67] 2019
Tenofovir alafenamid, tenofovir + IS: tenofovir alafenamid, tenofovir	Lidská plasma, likvor	SPE	Synergi Polar RP (2 x 50 mm, 2 µm)	0,1 % FA ve vodě 0,1 % FA v ACN	LC-MS/MS	0,1 – 0,5 ng/mL	[68] 2018
Tenofovir, lamivudin, nevirapin, adefovir + IS: Lamivudin, nevirapin	Vlasy	Extrakce pomocí MeOH	Platisil ODS C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm)	2 mM AmAc ve vodě 2 mM AmAc v MeOH	LC-MS/MS	6 – 77 pg/mg	[69] 2018
Tenofovir, emtricitabin, lamivudin	Suchá kapka krve	PP, LLE	BioBasic AX (2,1 x 50 mm, 5 µm)	750 mM AmAc ve vodě 75:25 mM AmAc:ACN	LC-MS/MS	100 fM/sample	[70] 2018
Ribavirin, Boceprevir, Telaprevir, Simeprevir, Daclatasvir, Sofosbuvir, GS 331007 +IS: Ribavirin	Lidská plasma	PP	Chromsystem MasterColumn®	0,2 % kys. octová a 2 mM AmAc v 95:5 voda:MeOH 0,2 % kys. octová a 2 mM AmAc v 5:95 voda:MeOH	LC-MS/MS	10 ng/mL	[71] 2018

ACN – acetonitril, AmAc – octan amonný, AmF – mravenčan amonný, DLLME – disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny, FA – kyselina mravenčí, IS – vnitřní standard, LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny, MeOH – methanol, PP – proteinová precipitace, SPE – extrakce na tuhé fázi

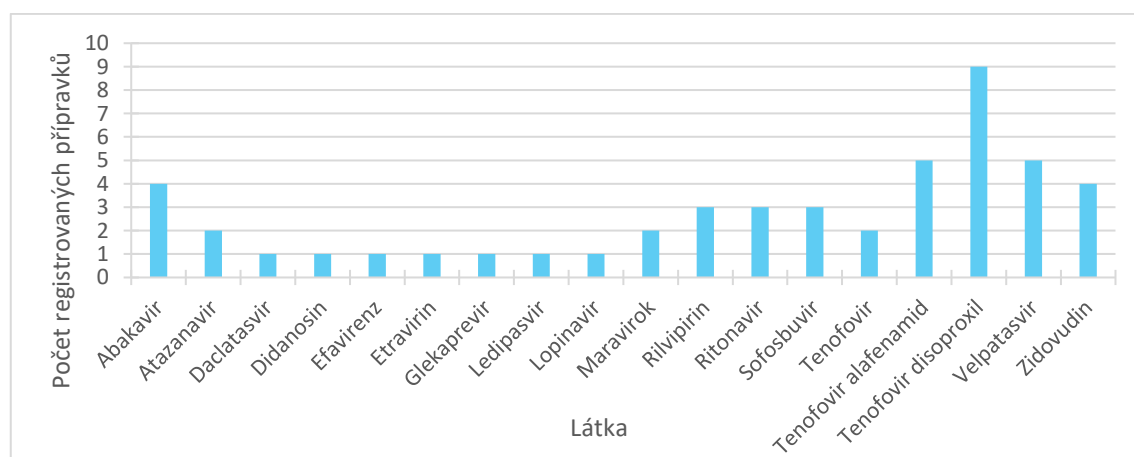
Počet publikací byl získán vyhledáváním v databázi Web of Science. Vyhledávání bylo názvem látky a slovo „chromatography“. Výsledky byly následně filtrovány na analytické aplikace a originální články. Na obrázku 7 je zobrazen vývoj počtu publikací pro jednotlivé analyty. Pro některé analyty bylo dosud vyvinuto pouze velmi málo analytických metod – biktegravir s 1 metodou, glekaprevir a doravirin se 2 metodami. Na druhém konci spektra stojí zidovudin se 167 publikovanými metodami a ritonavir se 162 metodami [72].

Obrázek 7: Počet publikovaných článků mezi rokem 2000 a dubnem 2020 zaměřujících se na chromatografickou bioanalýzu sledovaných analytů [72].



Na obrázku 8 je uveden počet přípravků registrovaných Státním ústavem pro kontrolu léčiv.

Obrázek 8: Počet léčivých přípravků registrovaných v ČR k 10. 3. 2020 [73].



4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

Chromatografický systém:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS system, Waters, USA
Pumpa:	ACQUITY Binary solvent manager, Waters, USA
Dávkovač vzorku:	ACQUITY Sample manager FL-1, Waters, USA
Kolonový termostat:	ACQUITY Column manager, Waters, USA
Program:	MassLynx 4.1, Waters, USA
Hmotnostní analyzátor:	Xevo TQ-XS triple quadrupole, Waters, USA
pH metr:	Hanna, Fisher scientific, Česká republika
Analytické váhy:	Sartorius ME5-OC, Sartorius, Německo
Třepačka:	IKA Vortex 3, Sigma-Aldrich, Česká republika
	Promax 1020, Fisher scientific, Česká republika
Ultrazvuková lázeň:	Sonorex Digitec, Bandelin Elextronic, Německo
Automatické pipety:	Eppendorf Reference 2, Eppendorf, Česká republika
Vakuová odparka:	Concentrator Plus, Eppendorf, Česká republika

Přehled použitých chromatografických kolon je shrnut v tabulce 6.

Tabulka 6: Seznam použitých chromatografických kolon a jejich rozměry.

Kolona	Rozměry	Dodavatel	Země dodavatele
CSH Fluoro-phenyl	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
CSH Phenyl-hexyl	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
CSH C18	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
BEH Shield RP18	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
BEH Phenyl	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
BEH C18	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
BEH Amide	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
Synchronis HILIC	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Thermo Fisher Scientific	Česká republika
BEH HILIC	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Waters	USA
Cortecs HILIC	3,0 x 100 mm, 1,6 µm	Waters	USA
Kinetex HILIC	2,1 x 100 mm, 1,7 µm	Phenomenex	USA
Luna HILIC	2,0 x 100 mm, 3 µm	Phenomenex	USA
Luna Omega SUGAR	2,0 x 100 mm, 3 µm	Phenomenex	USA
Ascentis Express HILIC	2,1 x 100 mm, 2,7 µm	Sigma-Aldrich	Česká republika
Ascentis Express OH5	2,1 x 100 mm, 2,7 µm	Sigma-Aldrich	Česká republika
Zorbax HILIC plus	2,1 x 100 mm, 3,5 µm	Agilent	USA

4.2. Použité chemikálie

Voda LC-MS grade připravená v přístroji MilliQ RG:	Milipore, Burlington, USA
Kyselina mravenčí 98 % – 100 % LC-MS grade:	Merck, Praha, Česká republika
Kyselina octová 100 % LC-MS grade:	Merck, Praha, Česká republika
Amoniak 25 % LC-MS grade:	Merck, Praha, Česká republika
Acetonitril LC-MS grade:	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie
Methanol LC-MS grade:	Avantor Performance Materials Nizozemsko
DMSO LC-MS grade:	Thermo scientific, Francie
InfinityLab Deactivator (medronová kyselina):	Agilent Technologies, USA
HBSS (10x) + Ca, + Mg:	Thermo scientific, Francie

Hydrogenuhlíčan sodný 99 %:	Merck, Praha, Česká republika
Albumin ≥ 95%:	Merck, Praha, Česká republika
HEPES 99 %:	Merck, Praha, Česká republika
Hydroxid sodný EMSURE®:	Merck, Praha, Česká republika
Methansulfonová kyselina 70 %:	Merck, Praha, Česká republika

V tabulce 7 jsou shrnuty SPE sorbenty použité pro μ -SPE-PT extrakce.

Tabulka 7: Seznam SPE sorbentů použitých pro μ -SPE-PT extrakce.

Sorbent	Dodavatel	Země dodavatele
Empore™ Anion-SR	Merck	Česká republika
Empore™ Cation	Merck	Česká republika
Empore™ Carbon	Merck	Česká republika
Empore™ Octadecyl C18	Merck	Česká republika
Empore™ Octyl C8	Merck	Česká republika
Empore™ Styrene Divinyl Benzene	Merck	Česká republika

Seznam použitých standardů a vnitřních standardů antivirotik je uveden v tabulce 8.

Tabulka 8: Seznam standardů a vnitřních standardů antivirotik.

Standard	Dodavatel	Země dodavatele	Čistota
Abakavir	TargetMol	USA	99,90 %
Atazanavir	TargetMol	USA	100 %
Biktegravir	MedChemExpress	USA	98,28 %
Boceprevir	TargetMol	USA	n/a
Daclatasvir	TargetMol	USA	99,80 %
Didanosin	TargetMol	USA	99,80 %
Doravirin	TargetMol	USA	99,80 %
Efavirenz	MedChemExpress	USA	99,99 %
Etravirin	TargetMol	USA	99,60 %
Glekaprevir	AOBIOUS	USA	98 %
Ledipasvir	MedChemExpress	USA	99,96 %
Lopinavir	TargetMol	USA	95 %
Maravirok	MedChemExpress	USA	99,71 %
Rilpivirin	TargetMol	USA	98,80 %
Ritonavir	TargetMol	USA	99,50 %
Saquinavir	MedChemExpress	USA	99,91 %
Simeprevir	TargetMol	USA	n/a
Sofosbuvir	MedChemExpress	USA	99,99 %
Tenofovir	MedChemExpress	USA	99,77 %
Tenofovir alafenamid	TargetMol	USA	99,75 %
Tenofovir disoproxil	TargetMol	USA	99,16 %
Tenofovir monoester	Gilead Sciences	USA	n/a
Velpatasvir	MedChemExpress	USA	99,95 %
Zidovudin	TargetMol	USA	99,90 %
Abakavir-d4	TRC Canada	Kanada	n/a
Atazanavir-d6	TRC Canada	Kanada	n/a
Rilpivirin-d6	TRC Canada	Kanada	n/a
Sofosbuvir-d5	TRC Canada	Kanada	n/a
Tenofovir alafenamid-d5	TRC Canada	Kanada	n/a

4.3. Příprava roztoků

4.3.1. Zásobní roztoky standardních látek

Byly připraveny zásobní roztoky standardů. Navážka standardu byla rozpuštěna v příslušném rozpouštědle dle tabulky 9. Použito bylo takové množství rozpouštědla, aby výsledná koncentrace odpovídala 1 mg/mL. V případě, že krystaly standardu byly příliš velké, aby se po protřepání roztoku rozpustily, byl roztok 10 – 30 minut ultrazvukován do rozpuštění.

Tabulka 9: Rozpouštědla použitá pro přípravu zásobních roztoků standardů.

Standard	Rozpouštědlo	Standard	Rozpouštědlo
Abakavir	H ₂ O	Maravirok	ACN
Atazanavir	50 % ACN v H ₂ O	Rilpivirin	90 % ACN v H ₂ O
Biktegravir	ACN	Ritonavir	ACN
Boceprevir	ACN	Saquinavir	DMSO
Daclatasvir	H ₂ O	Simeprevir	ACN
Didanosin	H ₂ O	Sofosbuvir	50 % MeOH v H ₂ O
Doravirin	ACN	Tenofovir	H ₂ O
Efavirenz	ACN	Tenofovir alafenamid	ACN
Etravirin	90 % ACN v H ₂ O	Tenofovir disoproxil	H ₂ O
Glekaprevir	50 % ACN v H ₂ O	Tenofovir monoester	H ₂ O
Ledipasvir	ACN	Velpatasvir	ACN
Lopinavir	ACN	Zidovudin	H ₂ O

Standardy byly uchovávány v lednici při 8 °C do spotřebování. V případě vzniku zbarvení roztoku ledipasviru, či velpatasviru byl připraven nový zásobní roztok.

4.3.2. Pracovní roztoky

Pracovní roztoky pro metodu na reverzních fázích byly připraveny smísením roztoků zásobních. Roztoky byly doplněny 20 % ACN, pokud není dále uvedeno jinak. Pracovní roztoky pro HILIC metody byly připravovány smísením roztoků zásobních a doplněním 100 % ACN, pokud dále není uvedeno jinak.

4.3.3. Mobilní fáze

Používané vodné složky mobilní fáze byly připraveny podle tabulky 10. V případě kyseliny octové, kyseliny mravenčí a amoniaku byl daný objem látky pipetován do odměrné baňky s vodou a následně byl vodou doplněn po rysku. V případě mravenčanu amonného (pH 3) a octanu amonného (pH 6) byl pipetován objem kyseliny do kádinky s vodou a titrován roztokem amoniaku do příslušného pH za indikace pomocí přístroje Hanna se skleněnou elektrodou. Následně byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. V případě octanu amonného (pH 9) byl do kádinky pipetován patřičný objem amoniaku a titrován byl roztokem kyseliny octové za indikace analogické předchozímu případu.

Ve finálním kroku optimalizace byl do mobilní fáze přidán InfinityLab deaktivátor – kyselina medronová pro zlepšení tvaru píku tenofoviru. Přidaná koncentrace byla 0,1 % do vodné složky MF i do ACN.

Tabulka 10: Použité mobilní fáze a objemy látek použitých pro přípravu aditiv MF.

Koncentrace [mM]	Objem [μ L]	Připravený objem [mL]	Koncentrace [mM]	Objem [μ L]	Připravený objem [mL]
Kyselina mravenčí			Mravenčan amonný (pH 3)		
1	3,8	100	1	3,8 HCOOH	100
5	18,9	100	5	18,9 HCOOH	100
10	37,7	100	10	37,7 HCOOH	100
25	94,3	100	25	94,3 HCOOH	100
Kyselina octová			Octan amonný (pH 6)		
1	5,7	100	1	5,7 HCOOH	100
5	28,6	100	5	28,6 HCOOH	100
10	57,2	100	10	57,2 HCOOH	100
25	143,0	100	25	143,0 HCOOH	100
Amoniak			Octan amonný (pH 9)		
1	7,5	100	1	7,5 amoniaku	100
5	37,7	100	5	28,6 amoniaku	100
10	75,3	100	10	57,2 amoniaku	100
25	188,2	100	25	143,0 amoniaku	100

Mobilní fáze byly připravovány těsně před měřením a používány maximálně 48 hodin.

4.3.4. HBS médium pro extrakce

Bylo připraveno Hanksovo vyvážené solné (HBS) médium pro ověření funkčnosti vyvinuté extrakční metody a pokusu o její validaci. Základní pufr byl připraven smísením 17,5 mg NaHCO_3 rozpuštěným ve vodě, 5 mL 10x koncentrovaného HBSS a následným doplněním do 50 mL vodou. Takto připravený pufr byl titrován do pH 7,4 roztokem HEPES, či NaOH. Následně bylo odebráno 20 mL, které byly přidány ke 200 mg albuminu. Zbýlý roztok byl dále titrován do pH 6,5 methansulfonovou kyselinou a opět bylo odebráno 20 mL tohoto roztoku a přidáno ke 200 mg albuminu.

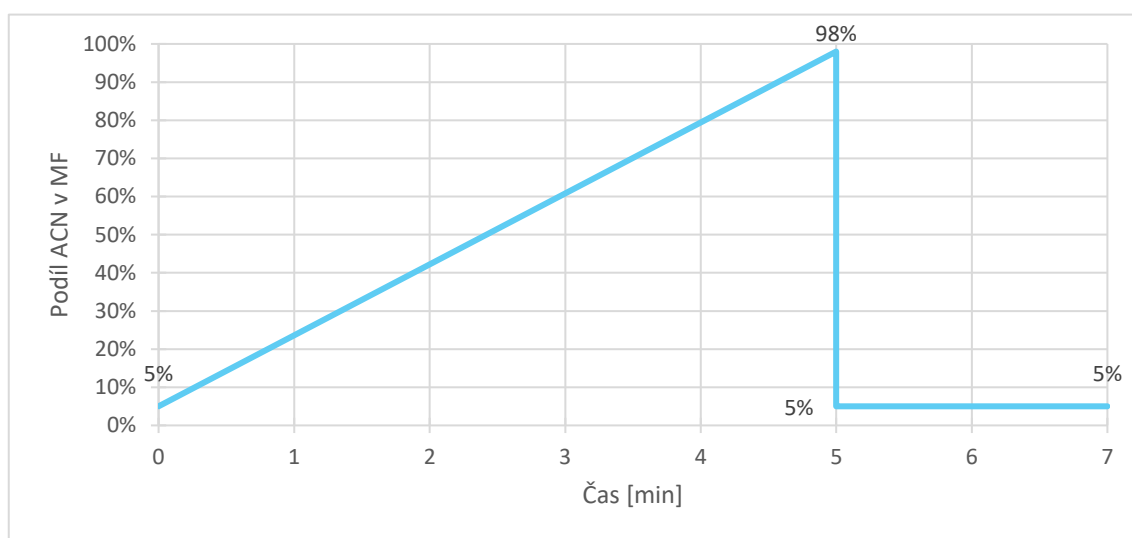
4.4. Vývoj metody UHPLC-MS/MS na reverzních fázích

4.4.1. Nastavení LC metody na reverzních fázích

Základní měření probíhala na koloně BEH C18. Počáteční ekvibrace trvala 15 minut, použitá gradientová eluce je zobrazena v obrázku 9.

Mobilní fáze:	složka A: 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí
	složka B: ACN
Průtok:	0,3 mL/min
Nastřikovaný objem:	2 μ L
Teplota kolony:	40°C
Teplota dávkovače vzorku:	10°C
Silná oplachová kapalina:	ACN
Slabá oplachová kapalina:	10 % ACN

Obrázek 9: Průběh gradientové eluce v systému reverzních fází.



4.4.2. Optimalizace MS metody

Pro základní MS skeny za účelem získání reálně měřených m/z a ověření vzniku $[M+H]^+$, resp. $[M-H]^-$ byl použit roztok v koncentraci 100 ng/mL. Skeny byly měřeny v ESI⁺ a ESI⁻.

Optimalizované parametry nastavení iontového zdroje byly napětí na kapiláře (0,5 kV – 3,5 kV), napětí na vstupním kuželu (10 V – 70 V), tlak zamlžujícího plynu (4 bar – 7 bar), průtok plynu na vstupním kuželu (150 L/h – 300 L/h), průtok desolvatačního plynu (300 L/h – 1 200 L/h) a desolvatační teplota (250 °C – 600 °C). Koncentrace použitého roztoku byla 10 ng/mL s přídavkem 100 ng/mL ZID, DID pro pozitivní mód a 10 ng/mL s přídavkem 100 ng/mL ABA, RIT, TDF pro mód negativní. Byla použita metoda záznamu vybraného iontu a vždy byly provedeny 2 nástřiky.

Ze skenu produktových iontů při 10 eV, 20 eV, 30 eV a 40 eV byly identifikovány fragmenty použité pro optimalizaci kolizní energie. Následně byla optimalizována kolizní energie v intervalu 5 eV – 55 eV, při kroku 5 eV a nejintenzivnější přechod byl vybrán pro SRM. Koncentrace měřeného roztoku byla v obou případech 10 ng/mL s přídavkem 100 ng/mL ZID,

DID, DAC, VEL, LED, ETR a RIL. Analogicky byla optimalizována kolizní energie pro negativní mód, kde byla koncentrace měřeného roztoku 10 ng/mL s přidavky 100 ng/mL ABA, RIT, TDF.

Srovnání pozitivního a negativního módu za účelem dosažení co nejlepších citlivostí pro konkrétní analyty bylo provedeno pomocí kalibračních křivek. Koncentrace použitých roztoků pro pozitivní mód byla 0,1 ng/mL – 50 ng/mL s přidavky 1 ng/mL – 500 ng/mL DAC, DID, ETR, LED, RIL, VEL, ZID a pro negativní mód 0,1 ng/mL – 50 ng/mL s přidavky 1 ng/mL – 500 ng/mL ATA, EFA, ETR, RIT, SIM. Výsledné měření bylo na kalibrační křivku převedeno pomocí lineární regrese uskutečněné v programu TargetLynx. Porovnáván byl především dolní limit kvantifikace a rozsah kalibrační křivky daný horním (ULOQ) a dolním (LLOQ) limitem kvantifikace. U LLOQ byl limitem poměr signálu k šumu nejméně 10, zároveň byly vzorky porovnány se slepým vzorkem. ULOQ byl omezen buď linearitou, nebo absencí vyšších koncentračních hladin.

4.4.3. Volba stacionární fáze v RP

Testovány byly stacionární fáze CSH Fluoro-phenyl, CSH Phenyl-hexyl, CSH C18, BEH Shield RP18, BEH Phenyl a BEH C18 viz tabulky 1 a 2. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přidavkem 100 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, VEL, SIM, RIL, LED. Nastavení chromatografické metody bylo zachováno stejné jako ve 4.4.1. SRM metoda byla nastavena na základě výsledků optimalizace.

4.4.4. Optimalizace složení mobilní fáze a průtokové rychlosti v RP

Testovány byly různé vodné složky mobilní fáze: kyselina mravenčí, kyselina octová, amoniak, mravenčan amonný pH 3 a octan amonný pH 9 v koncentraci 1 mM, 5 mM, 10 mM a 25 mM. Jako organická složka mobilní fáze byl zachován ACN. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přidavkem 100 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, VEL, SIM, RIL, LED. Použita byla optimalizovaná SRM metoda.

Byla optimalizována průtoková rychlost mobilní fáze. Testované průtokové rychlosti byly 0,1 mL/min – 0,5 mL/min. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přidavkem 100 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, VEL, SIM, RIL, LED. Použita byla optimalizovaná SRM metoda.

4.4.5. Vliv rozpouštědla vzorku v RP

Byl testován vliv rozpouštědla vzorku na tvar píků, odezvu a retenci jednotlivých analytů. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přidavkem 100 ng/mL ATA, EFA, ETR, RIT, SIM. Měřený roztok byl připraven v acetonitrilu 0 % - 100 %, dále pak v methanolu 0 % - 100 % a v kombinacích methanolu a acetonitrilu (10/90, 25/75, 50/50, 75/25, 90/10).

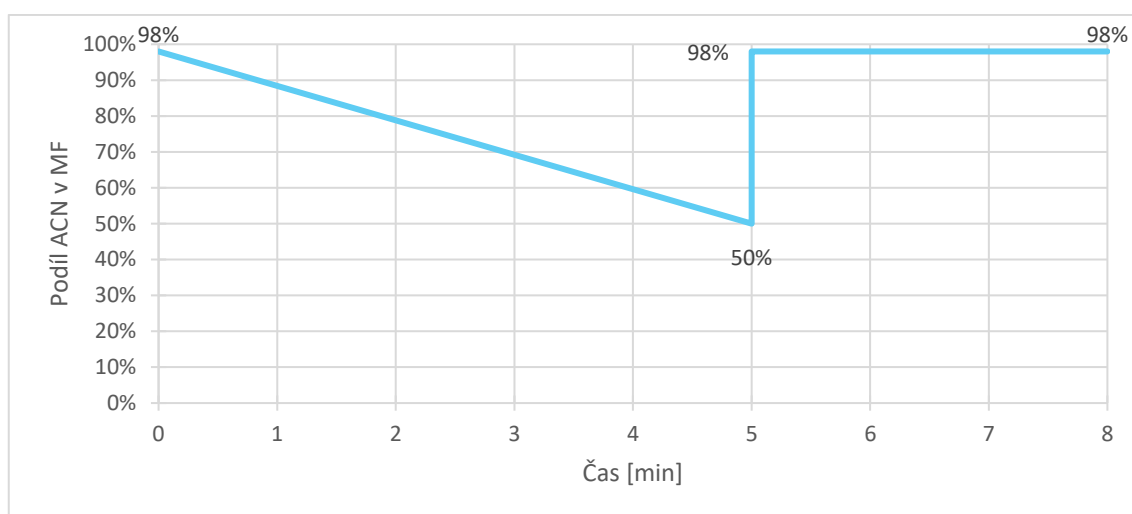
4.5. Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody

4.5.1. Nastavení LC metody v HILIC

Mobilní fáze:	složka A: 25 mM mravenčan amonný pH 3 složka B: ACN
Průtok:	0,3 mL/min
Nastřikovaný objem:	2 µL
Teplota kolony:	40°C
Teplota dávkovače vzorku:	10°C
Silná oplachová kapalina:	40 % ACN
Slabá oplachová kapalina:	90 % ACN

Použitá gradientová eluce je zobrazena v obrázku 10.

Obrázek 10: Průběh gradientové eluce HILIC.



4.5.2. Ověření optimalizace MS metody v HILIC

Ověření optimalizace MS metody bylo provedeno ve stejném rozsahu jako základní optimalizace popsaná ve 4.4.2., použita byla HILIC kolona BEH Amide. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přidavkem 100 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, VEL, EFA, SIM, RIL, LED. Použita byla optimalizovaná SRM metoda.

4.5.3. Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze v HILIC

Byl proveden screening stacionárních fází (BEH Amide, Synchronis HILIC, BEH HILIC, Cortecs HILIC, Kinetex HILIC, Luna HILIC, Luna Omega SUGAR, Ascentis Express HILIC, Ascentis Express OH5 a Zorbax HILIC plus). U každé stacionární fáze byl proveden screening základních vodných složek mobilních fází, mezi které patřily kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný (pH 3) a octan amonný (pH 6) v kombinaci s ACN. Použity byly 2 koncentrace: 10 mM a 25 mM. Pro zajištění optimální opakovatelnosti byl vždy po změně mobilní fáze zařazen krok promytí novou mobilní fází v poměru 60 % ACN : 40 % vodná složka MF při průtoku 0,5 mL/min. Použitá koncentrace měřeného roztoku byla 0,1 ng/mL s přidavkem 1 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, VEL, EFA, SIM, RIL, LED.

Byla hodnocena selektivita, která byla vypočtena z retenčních časů pomocí rovnice $\alpha = \frac{t_{R1} - t_M}{t_{R2} - t_M}$, kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy analytů a t_M je mrtvý retenční čas.

Dalším krokem optimalizace byla optimalizace gradientové eluce pro Ascentis Express HILIC s 25 mM AmF pH 3 jako mobilní fází. Testována byla různá složení mobilní fáze na konci gradientové eluce během 5 minut: 40 % ACN, 50 % ACN a 60 % ACN. Koncentrace měřeného roztoku byla 0,1 ng/mL s přídatkem 1 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, EFA, VEL, SIM, RIL, LED. Použita byla optimalizovaná SRM metoda.

Dále byla testována průtoková rychlost mobilní fáze od 0,2 mL/min do 0,5 mL/min. Koncentrace měřeného roztoku byla 0,1 ng/mL s přídatkem 1 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, EFA, VEL, SIM, RIL, LED. Použita byla optimalizovaná SRM metoda.

4.5.4. Vliv rozpouštědla vzorku v HILIC

Byl testován vliv rozpouštědla vzorku na odezvu a tvar píku jednotlivých analytů. Koncentrace měřeného roztoku byla 0,1 ng/mL s přídatkem 1 ng/mL ZID, DID, DAC, ETR, VEL, EFA, SIM, RIL, LED, roztok byl připravený v acetonitrilu ve vodě 0 % - 100 % a v kombinacích methanolu a acetonitrilu (10/90, 25/75, 50/50, 75/25, 90/10).

4.6. Vývoj μ -SPE-PT metody

4.6.1. Výběr sorbentu a optimalizace jeho množství

Testováno bylo 6 sorbentů: oktyl (C8), oktadecyl (C18), styrendivinybenzen (SDB), porézní grafitový uhlík (PGC), aniontový (AX) a kationtový (CX) iontoměnič. 3 vrstvy sorbentu byly plněny do pipetových špiček o objemu 200 μ L. Pro každé měření byly připraveny 3 špičky, ve kterých byla provedena extrakce. Nanášený roztok byl v koncentraci 50 ng/mL s přídatkem 500 ng/mL SIM, ZID, VEL, DAC, RIL, LED, DID, ETR ve vodě. Z roztoku eluátu ředěného do 20 % ACN byly provedeny 3 nástřiky.

Extrakce byla provedena následujícím postupem: aktivace sorbentu 100 μ L ACN, kondicionace 100 μ L vody, nanesení 100 μ L vzorku, eluce 100 μ L činidla. Centrifuga byla nastavena následovně: 5 000 otáček/min po dobu 5 – 15 minut, teplota během centrifugace 6°C. Operativně byly měřeny nejen roztoky pro eluci, ale i roztok po nanesení vzorku pro získání informace o zachycení analytů sorbentem. Pro měření byla použita optimalizovaná metoda RP-UHPLC-MS/MS.

Bylo testováno množství sorbentu nutného pro extrakci cílových látek. Špičky byly připraveny v triplicátu. Postup extrakce, nastavení centrifugy a koncentrace nanášených roztoků byly shodné jako v případě screeningů sorbentů. Bylo testováno 1 – 6 vrstev sorbentu C18 a AX. Měření byly roztoky po nanesení vzorku a po extrakci ředěné do 20 % ACN.

Dále byla provedena optimalizace kombinace vybraných sorbentů. Připravené kombinace byly následující: 1x C18, 1x AX; 1x C18, 2x AX; 2x C18, 1x AX; 2x C18, 2x AX; 2x C18, 3x AX; 3x C18, 2x AX; 3x C18, 3x AX. Měřený roztok byl shodný jako v předcházejících případech. Podmínky pro centrifugaci byly upraveny na 7 000 otáček/min po dobu 10 – 50 minut.

4.6.2. Optimalizace složení elučního činidla

Testován byl podíl ACN v elučním činidle, a to v rozmezí 80 % - 100 %. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přídatkem 100 ng/mL DAC, ETR, SIM. Postup extrakce byl shodný jako v případě 4.7.1. Podmínky centrifugace byly 8 000 otáček/min po dobu 7 – 30 minut. Eluát byl ředěn do 20 % ACN.

Dále byl testován přídavek FA do elučního činidla. Postup extrakce byl shodný jako v předchozím případě, měřený roztok a jeho úprava po eluci rovněž. Testované množství přidávané FA bylo 10 mM – 500 mM.

4.6.3. Optimalizace složení promývacího činidla

Do postupu extrakce byl zařazen krok promytí. Promytí bylo řazeno mezi krok nanesení vzorku a eluci. Testovaná činidla byla 1 % ACN, 1 – 5 % MeOH, 1 – 10 mM amoniak ve vodě a voda v objemu 100 µL. Koncentrace měřeného roztoku byla 10 ng/mL s přídavkem 100 ng/mL DID, DAC, ETR. Podmínky centrifugace a úprava eluátu byly shodné jako v bodě 4.7.1. Podmínky centrifugace byly 8 000 otáček/min po dobu 7 – 30 minut.

4.6.4. Odpaření a rekonstituce vzorku

Byla testována možnost odpaření a rekonstituce extraktu. Extrakt byl odpařen ve vakuové odparce. K odparku A bylo přidáno 10 µL ACN, k odparku B 20 µL ACN a k odparku C 30 µL ACN. Následně byl roztok třepán po dobu 10 minut na třepačce. Poté byly jednotlivé roztoky doplněny do 100 µL vodou a 15 minut ultrazvukovány. Výsledné roztoky byly měřeny, byly provedeny 2 nástřiky. Koncentrace extrahovaného roztoku byla 10 ng/mL s přídavkem 100 ng/mL DID, DAC, ETR.

4.6.5. Extrakce z HBS média

HBS média byla obohacena analyty. Připravený roztok pro extrakci byl v koncentraci 10 ng/mL s přídavkem 100 ng/mL DID, DAC, ETR. Extrakce byla provedena za optimalizovaných podmínek. Extrakt byl ředěn do 20 % ACN.

4.7. Validace metody na reverzních fázích

Byla hodnocena přesnost, správnost a matricové efekty pro HBS médium pH 6,5 a 7,4. Vzorky matricové kalibrační křivky pro toto měření byly upraveny optimalizovanou extrakční metodou. Koncentrace zásobního roztoku a kalibračního rozmezí je shrnuta v tabulce 11. Kalibrace byla hodnocena za použití vnitřních standardů. Přiřazení vnitřních standardů je shrnuto v tabulce 11. Koncentrace vnitřních standardů byla 1 ng/mL.

Přesnost metody byla hodnocena podle Guideline on bioanalytical method validation od European Medicines Agency jako relativní směrodatná odchylka z 5-ti jednotlivých opakování extrakcí pro hladinu A – E uvedenou v tabulce 11. Správnost byla hodnocena na základě stejného dokumentu porovnáním koncentrace určené vyvinutou metodou a teoretické koncentrace na dané hladině [47].

Následně byly hodnoceny matricové efekty, opět podle zmíněného guideline metodou postextrakčního přídávku. Měřeny byly na dvou koncentračních hladinách: A a C. Koncentrace jednotlivých analytů na těchto hladinách jsou shrnuty v tabulce 11. Matricové efekty byly vyhodnoceny za použití vnitřních standardů, jejichž koncentrace byla 1 ng/mL [47].

Tabulka 11: Koncentrace roztoků pro měření matricové kalibrační křivky, matricových efektů, správnosti a přesnosti a přiřazení vnitřních standardů v reverzně fázové metodě.

Analyt	Koncentrace [ng/mL]							Vnitřní standard
	Zásobní roztok	Kalibrační rozmezí	Hladina A	Hladina B	Hladina C	Hladina D	Hladina E	
Abakavir	10	0,01 – 2	1	0,2	0,05	0,02	0,01	Abakavir
Atazanavir	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Atazanavir
Biktegravir	10	0,01 – 2	1	0,2	0,05	0,02	0,01	Sofosbuvir
Boceprevir	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Atazanavir
Daclatasvir	100 000	100 – 20 000	10 000	2 000	500	200	100	Tenofovir alafenamid
Didanosin	100 000	100 – 20 000	10 000	2 000	500	200	100	Abakavir
Doravirin	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Atazanavir
Efavirenz	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Atazanavir
Etravirin	10 000	10 – 2 000	1 000	200	50	20	10	Atazanavir
Glekaprevir	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Atazanavir
Ledipasvir ²⁺	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Sofosbuvir
Lopinavir	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Atazanavir
Maravirok	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Tenofovir alafenamid
Rilpivirin	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Rilpivirin
Ritonavir	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Atazanavir
Saquinavir	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Sofosbuvir
Simeprevir	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Atazanavir
Sofosbuvir	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Sofosbuvir
Tenofovir	100	0,1 – 20	10	2	0,5	0,2	0,1	Abakavir
Tenofovir alafenamid	10	0,01 – 2	1	0,2	0,05	0,02	0,01	Tenofovir alafenamid
Tenofovir disoproxil	10	0,01 – 2	1	0,2	0,05	0,02	0,01	Tenofovir alafenamid
Tenofovir monoester	10	0,01 – 2	1	0,2	0,05	0,02	0,01	Abakavir
Velpatasvir ²⁺	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Sofosbuvir
Zidovudin	1 000	1 – 200	100	20	5	2	1	Tenofovir alafenamid

4.8. Validace HILIC metody

Matricová kalibrace pro HILIC byla připravena optimalizovanou extrakční metodou, odparek byl rekonstituován 100 µL ACN a výsledný roztok byl 2x nastříkván. Koncentrace vnitřních standardů byla 1 ng/mL. Přiřazení vnitřních standardů je v tabulce 12. Přesnost a správnost v médiu o pH 6,5 byla hodnocena stejným způsobem jako v RP. Použité hladiny A – F jsou v tabulce 12. Matricové efekty byly hodnoceny metodou postextrakčního přidavku. Měření byly na dvou koncentračních hladinách A a E v HBS médiu pH 6,5, které jsou v tabulce 12. Vnitřní standardy byly přidány v koncentraci 1 ng/mL. Z časových důvodů nebyla metoda validována pro HBS médium pH 7,4 [47].

Tabulka 12: Koncentrace roztoků pro měření matricové kalibrační křivky, matricových efektů, správnosti a přesnosti a přiřazení vnitřních standardů v HILIC.

Analyt	Koncentrace [ng/mL]							Vnitřní standard
	Kalibrační rozmezí	Hladina A	Hladina B	Hladina C	Hladina D	Hladina E	Hladina F	
Abakavir	0,001 – 2	1,000	0,2	0,05	0,02	0,01	0,001	Abakavir
Atazanavir	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Atazanavir
Biktegravir	0,001 – 2	1,000	0,2	0,05	0,02	0,01	0,001	Sofosbuvir
Boceprevir	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Atazanavir
Daclatasvir	10 – 20 000	20 000	2000	500	200	100	10	Tenofovir alafenamid
Didanosin	10 – 20 000	20 000	2000	500	200	100	10	Abakavir
Doravirin	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Atazanavir
Efavirenz	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Atazanavir
Etravirin	1 – 2 000	1 000,000	200	50	20	10	1	Atazanavir
Glekaprevir	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Atazanavir
Ledipasvir ²⁺	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Sofosbuvir
Lopinavir	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Atazanavir
Maravirok	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Tenofovir alafenamid
Rilpivirin	0,1 – 200	100	20	5	2	1	0,1	Rilpivirin
Ritonavir	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Atazanavir
Saquinavir	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Sofosbuvir
Simeprevir	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Atazanavir
Sofosbuvir	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Sofosbuvir
Tenofovir	0,01 – 20	10,000	2	0,5	0,2	0,1	0,01	Abakavir
Tenofovir alafenamid	0,001 – 2	1,000	0,2	0,05	0,02	0,01	0,001	Tenofovir alafenamid
Tenofovir disoproxil	0,001 – 2	1,000	0,2	0,05	0,02	0,01	0,001	Tenofovir alafenamid
Tenofovir monoester	0,001 – 2	1,000	0,2	0,05	0,02	0,01	0,001	Abakavir
Velpatasvir ²⁺	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Sofosbuvir
Zidovudin	0,1 – 200	100,000	20	5	2	1	0,1	Tenofovir alafenamid

4.9. Srovnání citlivosti metody na reverzních fázích a HILIC metody

Byly měřeny kalibrační křivky pro optimalizované metody RP i HILIC. Použité roztoky byly pro RP ředěny ze základního roztoku v koncentraci 100 ng/mL s přídavkem 1 000 ng/mL DAC, DID, ETR ve 20 % ACN od 0,001 ng/mL do 50 ng/mL a pro HILIC z roztoku koncentrace 1 ng/mL s přídavkem 10 ng/mL DAC, DID, ETR od 0,00001 ng/mL do 0,5 ng/mL.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Vývoj metody UHPLC-MS/MS na reverzních fázích

5.1.1. Optimalizace MS metody

Cílem optimalizace hmotnostně spektrometrické metody bylo dosažení co nejvyšší citlivosti pro sledované analyty.

Výsledky měření základních skenů v ESI, při kterých byl ověřen vznik $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$ a získány reálné hodnoty m/z naměřené hmotnostním spektrometrem, jsou shrnuty v tabulce 13.

Tabulka 13: Molekulová hmotnost, teoretické a reálné m/z $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$.

Analyt	Monoizotopická hmotnost [Da]	Teoretická $[M+H]^+$	Naměřená $[M+H]^+$	Teoretická $[M-H]^-$	Naměřená $[M-H]^-$
Abakavir	286,15	287,16	287,16	285,15	Neionizuje
Atazanavir	704,39	705,40	705,26	703,38	703,20
Biktegravir	449,12	450,13	450,06	448,11	447,99
Boceprevir	519,34	520,35	520,26	518,33	518,19
Daclatasvir	738,39	739,39	739,23	737,38	737,17
Didanosin	236,09	237,10	236,94	235,08	235,04
Doravirin	425,05	426,06	426,00	424,04	423,93
Efavirenz	315,02	316,03	316,01	314,02	313,95
Etravirin	434,04	435,06	435,00	433,04	432,95
Glekaprevir	838,30	839,31	839,14	837,29	837,09
Ledipasvir	888,41	889,42	889,25	887,41	887,19
Ledipasvir ²⁺		445,21	445,38	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion	
Lopinavir	628,36	629,37	629,25	627,36	627,19
Maravirok	513,32	514,34	514,25	512,32	512,19
Rilpivirin	366,16	367,17	367,13	365,15	365,06
Ritonavir	720,31	721,32	721,18	719,31	719,30
Saquinavir	670,38	671,39	671,26	669,38	669,20
Simeprevir	749,29	750,30	750,15	748,28	748,08
Sofosbuvir	529,16	530,17	530,07	528,16	528,02
Tenofovir	287,07	288,09	288,08	286,07	286,00
Tenofovir alafenamid	476,19	477,20	477,14	475,19	475,07
Tenofovir disoproxil	519,17	520,18	520,09	518,17	Neionizuje
Tenofovir monoester	403,13	404,13	404,08	402,12	402,01
Velpatasvir	882,40	883,41	883,26	881,40	881,20
Velpatasvir ²⁺		442,21	442,38	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion	
Zidovudin	267,10	268,10	268,10	266,09	266,03

V případě VEL a LED vznikaly v pozitivním módu i dvojnásobně nabitě ionty. U většiny analytů docházelo ke tvorbě sodíkových aduktů, které ovšem nebyly intenzivnější než protonované ionty. V negativním módu nedošlo k ionizaci ABA a TDF. V negativním módu vznikl adukt MAR s kyselinou mravenčí.

5.1.1.1. Optimalizace parametrů iontového zdroje

V tabulce 14 jsou shrnuty optimalizované parametry iontového zdroje. Jednotlivé hodnoty byly voleny tak, aby všechny analyty poskytovaly signál a co nejvyšší odezvu. Křivky jednotlivých parametrů zpravidla sledovaly stejný průběh.

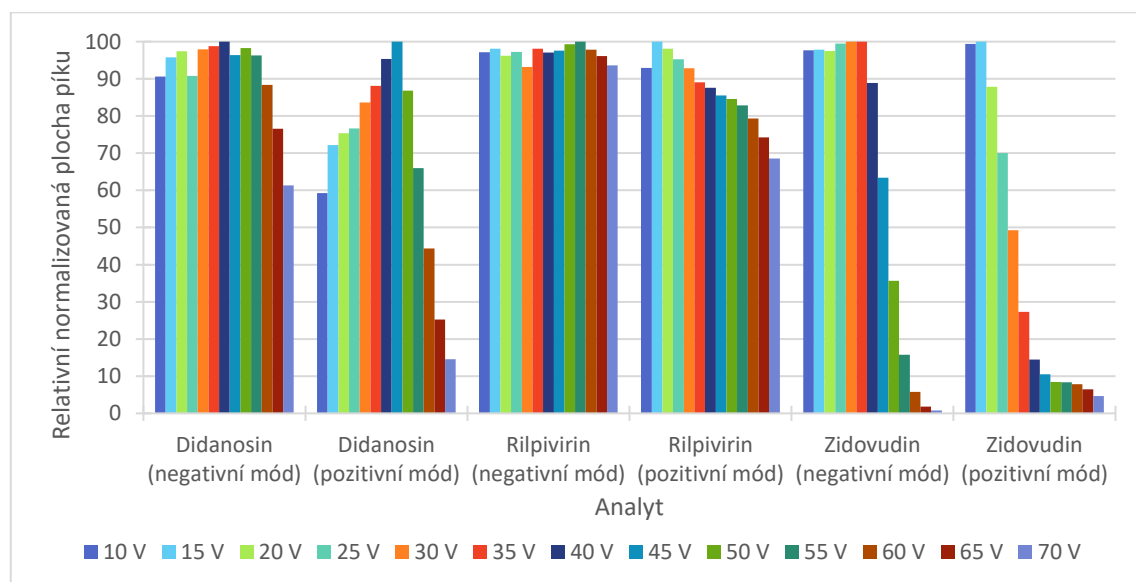
Tabulka 14: Souhrn optimalizovaných parametrů iontového zdroje.

Parametr	Optimalizované rozmezí	Pozitivní mód	Negativní mód
Napětí na kapiláře	0,5 kV – 3,5 kV	1,0 kV	1,5 kV
Napětí na vstupním kuželu	10 V – 70 V	Individuální	
Tlak zamlžujícího plynu	4,0 bar – 7,0 bar	5,0 bar	5,5 bar
Průtok plynu na vstupním kuželu	150 L/h – 300 L/h	150 L/h	150 L/h
Průtok desolvatačního plynu	300 L/h – 1 200 L/h	1 000 L/h	1 000 L/h
Desolvatační teplota	250 °C – 600 °C	500 °C	500 °C

Napětí na vstupním kuželu bylo nastaveno individuálně pro každý analyt. V případě daclatasviru, etravirinu, dvojnásobně nabitého ledipasviru, simepreviru a dvojnásobně nabitého velpatasviru s rostoucím napětím docházelo pouze k poklesu signálu. Na obrázku 11 byly jako příklad optimalizace vybrány DID, RIL, ZID v pozitivním a negativním módu. Optimalizované hodnoty budou využity pro tvorbu SRM.

Analogicky byly optimalizovány všechny parametry i v negativním módu. Odezvy s rostoucím napětím zůstávají u stejných hodnot a následně po překonání určitého napětí prudce rostou k maximu. Tento trend je pozorovatelný u lopinaviru, maraviroku, ritonaviru a saquinaviru. Ledipasvir v případě těchto měření neposkytoval signál, byla pro něho tedy zachována hodnota napětí použitého v ostatních měřeních. Výsledky pro vybrané analyty jsou na obrázku 11. Optimalizované hodnoty budou využity pro tvorbu SRM přechodů.

Obrázek 11: Srovnání optimalizace CV v pozitivním a negativním módu pro vybrané analyty.



5.1.1.2. Sken produktových iontů a optimalizace kolizní energie

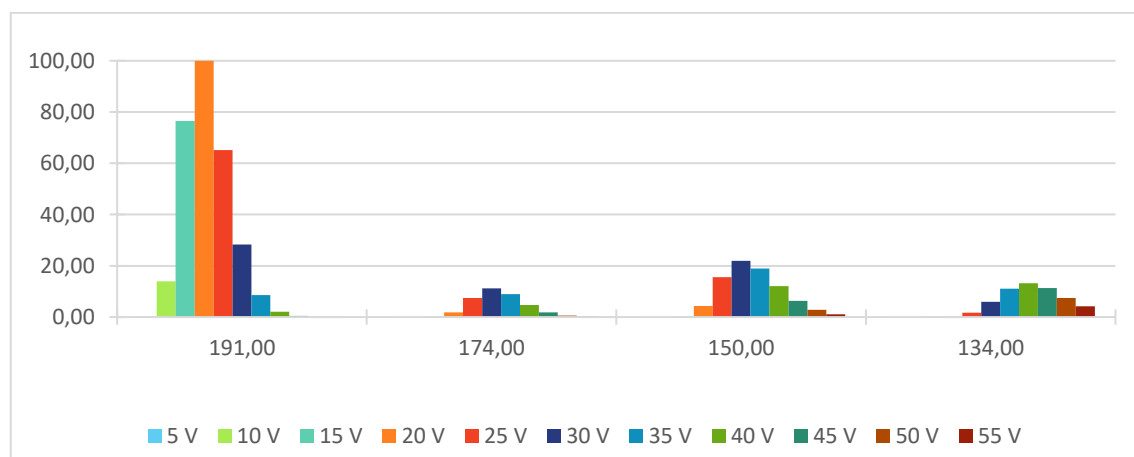
Fragmenty byly identifikovány z měření skenů produktových iontů v pozitivním a negativním módu při 10 eV, 20 eV, 30 eV a 40 eV. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 15. Z identifikovaných fragmentů byly následně sestaveny SRM přechody pro vlastní optimalizaci kolizní energie v rozmezí 5 – 55 eV v pozitivním i negativním módu.

Tabulka 15: Nejintenzivnější fragmenty pozorované ve skenu produktových iontů v pozitivním a negativním módu.

Analyt	Pozitivní mód				Negativní mód			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Abakavir	191,0	174,0	150,0	134,0	Neionizuje			
Atazanavir	534,0	335,1	168,0	143,9	445,7	278,0	685,0	212,8
Biktegravir	289,0	145,0	407,0	126,0	286,0	176,9	428,0	363,9
Boceprevir	308,1	421,1	438,0	397,0	419,1	249,1	195,0	169,0
Daclatasvir	582,1	565,1	513,1	339,0	531,1	389,1	705,2	673,1
Didanosin	193,0	191,0	163,9	137,0	216,9	175,0	135,0	134,0
Doravirin	314,9	259,9	294,9	275,0	271,0	178,1	151,9	230,9
Efavirenz	243,9	231,9	168,0	223,9	298,1	243,9	221,9	179,7
Etravirin	162,9	144,0	130,0	304,0	387,0	341,1	296,9	415,0
Glekaprevir	819,1	684,1	229,0	196,3	702,2	335,1	134,0	456,1
Ledipasvir	849,1	732,1	637,0	479,9	855,1	823,0	730,1	742,1
Ledipasvir ²⁺	130,0	232,0	385,0	366,5	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion			
Lopinavir	447,1	429,1	183,0	155,0	409,9	310,0	198,1	510,5
Maravirok	389,1	280,1	124,0	260,0	492,1	472,2	124,0	393,9
Rilpivirin	207,0	195,0	182,0	156,0	320,8	141,9	276,8	246,7
Ritonavir	296,1	268,0	426,1	197,0	673,7	604,0	434,2	390,1
Saquinavir	570,1	416,0	242,0	367,0	623,1	497,3	383,1	400,7
Simeprevir	315,0	287,0	150,1	136,0	120,2	456,7	565,9	376,1
Sofosbuvir	243,0	200,0	166,0	399,0	508,1	286,0	192,0	414,0
Tenofovir	159,0	176,1	136,0	206,0	239,9	206,9	267,8	134,0
Tenofovir alafenamid	270,0	346,0	206,0	176,0	176,0	133,9	287,0	268,1
Tenofovir disoproxil	288,0	270,0	206,0	175,0	486,0	446,1	245,1	414,2
Tenofovir monoester	270,0	288,0	206,0	176,0	372,0	267,9	328,0	286,0
Velpatasvir	851,2	709,1	643,1	709,1	849,1	817,1	724,0	641,1
Velpatasvir ²⁺	339,0	405,0	164,0	235,0	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion			
Zidovudin	180,9	136,8	127,0	152,8	247,9	223,0	221,8	160,0

Výsledný souhrn optimalizovaných podmínek SRM přechodů pro pozitivní i negativní mód, včetně CV a kolizních energií je uveden v tabulce 16. Podmínky byly voleny tak, aby SRM přechod poskytoval, co nejvyšší signál pro danou látku – viz obrázek 12.

Obrázek 12: Optimalizace CE pro abakavir v pozitivním módu normalizovaná na vybranou CE vybraného fragmentu.



V negativním módu je v případě etravirinu zaveden přechod pseudoSRM, kdy prekurzorový iont je zároveň fragmentem a nedochází k fragmentaci. Tento přístup byl zvolen, protože v negativním módu se nepodařilo pro etravirin úspěšně optimalizovat kolizní energii kvůli nedostatečné odezvě u vybraných fragmentů.

Tabulka 16: Souhrn optimalizovaných SRM pro pozitivní a negativní mód.

Analyt	Pozitivní mód				Negativní mód			
	[M+H] ⁺	Fragment	CV [V]	CE [eV]	[M-H] ⁻	Fragment	CV [V]	CE [eV]
Abakavir	287,16	191,0	15	20	Neionizuje			
Atazanavir	705,26	168,0	25	50	703,20	278,0	35	20
Biktegravir	450,06	289,0	15	30	447,99	176,9	10	35
Boceprevir	520,26	308,1	35	25	518,19	419,1	50	20
Daclatasvir	739,23	565,1	10	40	737,17	705,2	30	20
Didanosin	236,94	193,0	45	15	235,04	135,0	40	20
Doravirin	426,00	314,9	40	20	423,93	151,9	10	30
Efavirenz	316,01	243,9	20	15	313,95	298,1	10	10
Etravirin	435,00	162,9	10	25	432,95	433,0	20	0
Glekaprevir	839,14	819,1	15	15	837,09	134,0	30	40
Ledipasvir	889,25	732,1	15	40	887,19	855,1	30	20
Ledipasvir ²⁺	445,38	130,0	10	25	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion			
Lopinavir	629,25	155,0	15	40	627,19	198,1	65	25
Maravirok	514,25	280,1	15	30	512,19	492,1	70	20
Rilpivirin	367,13	207,0	15	30	365,06	141,9	55	25
Ritonavir	721,18	296,1	15	20	719,30	434,2	60	20
Saquinavir	671,26	570,1	55	30	669,20	497,3	60	25
Simeprevir	750,15	315,0	10	30	748,08	120,2	55	30
Sofosbuvir	530,07	243,0	15	20	528,02	508,1	40	10
Tenofovir	288,08	176,1	15	25	286,00	134,0	n/a	25
Tenofovir alafenamid	477,14	270,0	15	30	475,07	176,0	50	20
Tenofovir disoproxil	520,09	270,0	15	25	Neionizuje			
Tenofovir monoester	404,08	270,0	15	20	402,01	328,0	25	15
Velpatasvir	883,26	709,1	15	35	881,20	849,1	20	20
Velpatasvir ²⁺	442,38	405,0	10	25	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion			
Zidovudin	268,10	127,0	15	10	266,03	223,0	30	10

CV – napětí na vstupním kuželu, CE – kolizní energie

5.1.1.3. Srovnání citlivosti pozitivního a negativního módu v RP

Na základě porovnání spodního limitu kvantifikace a lineárního rozsahu byly pro didanosin, ledipasvir, rilpivirin, velpatasvir a zidovudin zvoleny optimalizované SRM přechody v negativním módu (v tabulce 17 označeny zeleně). Pro ostatní analyty byl zvolen mód pozitivní.

Tabulka 17: Souhrn údajů lineární regrese v pozitivním a negativním módu v RP.

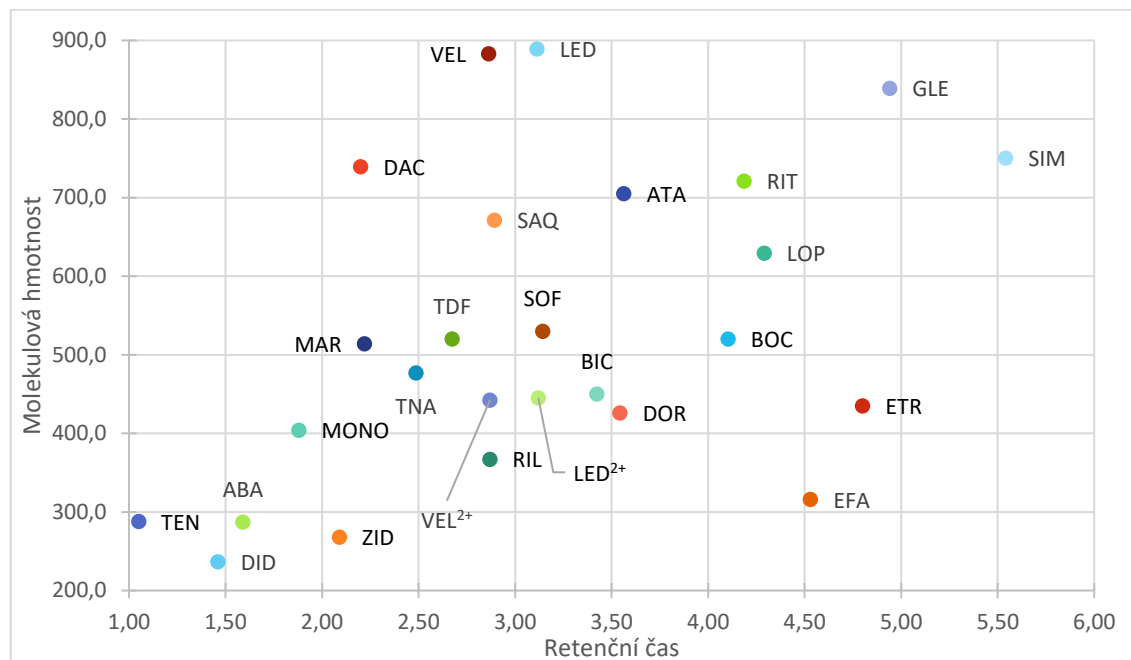
Analyt	Pozitivní mód			Negativní mód		
	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient
Abakavir	0,1	50	0,99934	Neionizuje		
Atazanavir	0,1	50	0,99991	Neionizuje		
Biktegravir	0,1	50	0,99973	0,1	50	0,99907
Boceprevir	0,1	50	0,99981	0,1	50	0,99936
Daclatasvir	0,1	20	0,99622	0,5	20	0,99539
Didanosin	20	500	0,99438	0,1	50	0,99928
Doravirin	0,1	50	0,99979	0,5	50	0,99853
Efavirenz	0,1	50	0,99942	Neionizuje		
Etravirin	0,1	50	0,99850	1	500	0,99909
Glekaprevir	0,1	50	0,99968	0,1	50	0,99966
Ledipasvir	1	200	0,99807	0,2	50	0,99902
Ledipasvir ²⁺	0,1	20	0,99801	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion		
Lopinavir	0,1	50	0,99972	0,1	50	0,99974
Maravirok	0,1	20	0,99801	0,5	50	0,99372
Rilpivirin	1	500	0,99806	0,1	50	0,99953
Ritonavir	0,1	50	0,99899	1	500	0,99717
Saquinavir	0,1	20	0,99855	0,1	50	0,99920
Simeprevir	0,1	10	0,99424	0,1	10	0,99334
Sofosbuvir	0,1	50	0,99992	0,1	50	0,99946
Tenofovir	1	50	0,99605	2	50	0,99624
Tenofovir alafenamid	0,1	50	0,99995	0,1	50	0,99954
Tenofovir disoproxil	0,1	50	0,99903	Neionizuje		
Tenofovir monoester	0,1	50	0,99992	0,1	50	0,99972
Velpatasvir	1	200	0,99852	0,2	50	0,99765
Velpatasvir ²⁺	0,1	20	0,99867	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion		
Zidovudin	1	500	0,99986	0,2	50	0,99927

Většina analytů poskytovala signál (plochu píku) v řádu vyšších tisíců, či desítek tisíců i na nejnižší hladině kalibrační křivky – 0,1 ng/mL u analytů s přídatkem 1 ng/mL. Je tedy možné dosáhnout i vyšší citlivosti. Tato možnost byla testována v rámci srovnání módu RP a HILIC.

5.1.2. Volba stacionární fáze v systému reverzních fází

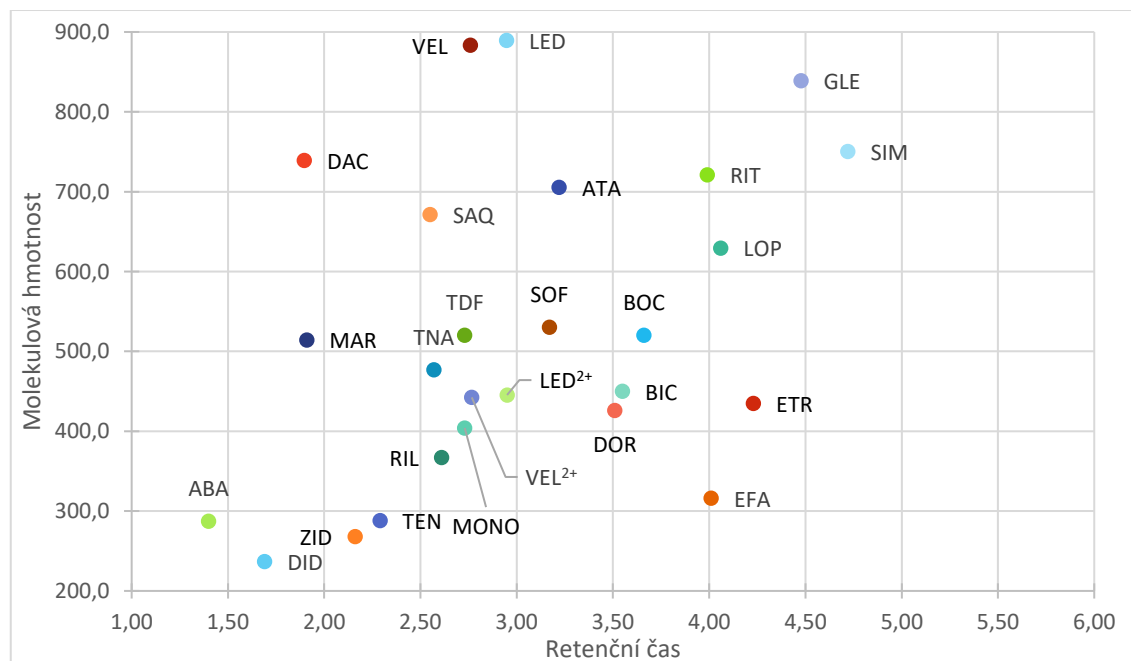
Na základě experimentu popsaného v kapitole 4.4.3. byly vytvořeny grafy závislosti molekulové hmotnosti na retenčním čase, podle kterých je možno posoudit selektivitu jednotlivých kolon. Grafy jsou na obrázcích 13 – 18.

Obrázek 13: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu BEH Shield RP18.



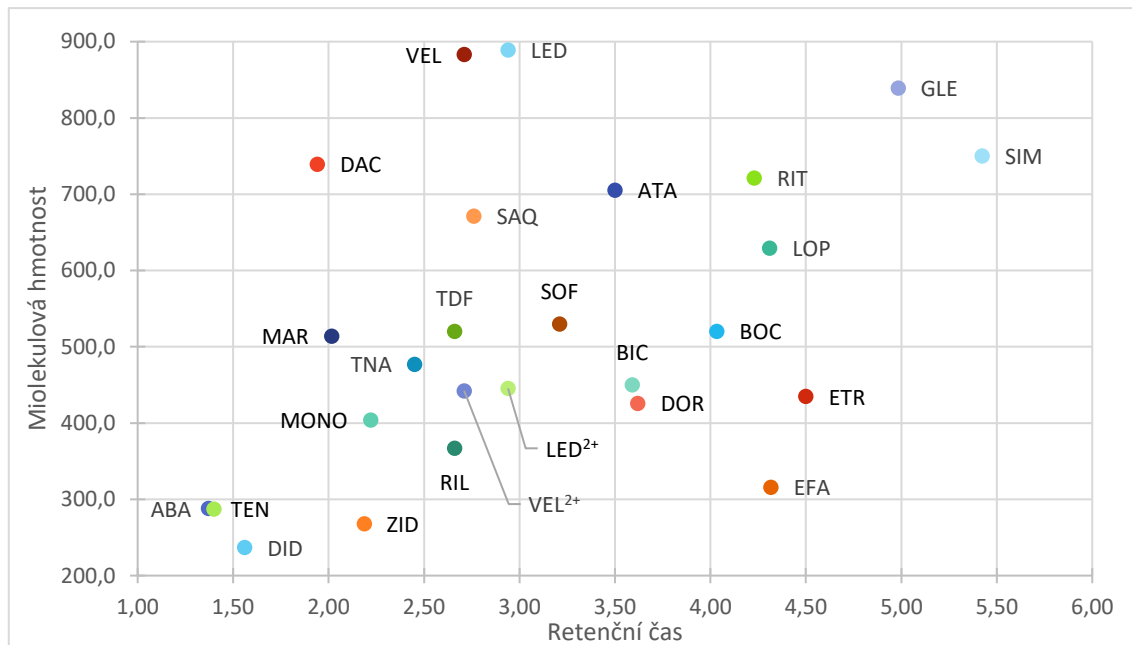
Na koloně BEH Shield RP18 byla získána nejlepší separaci kritických analytů (blízká m/z a blízký retenční čas) TDF s MAR, TEN s ABA, LED s VEL a dvojnásobně nabitý LED s BIC, zároveň zde došlo pouze ke 4 koelucím (MAR s DAC; RIL s VEL a SAQ; LED se SOF a ATA s DOR). BIC poskytoval rozmytý pík.

Obrázek 14: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu CSH fluoro-phenyl.



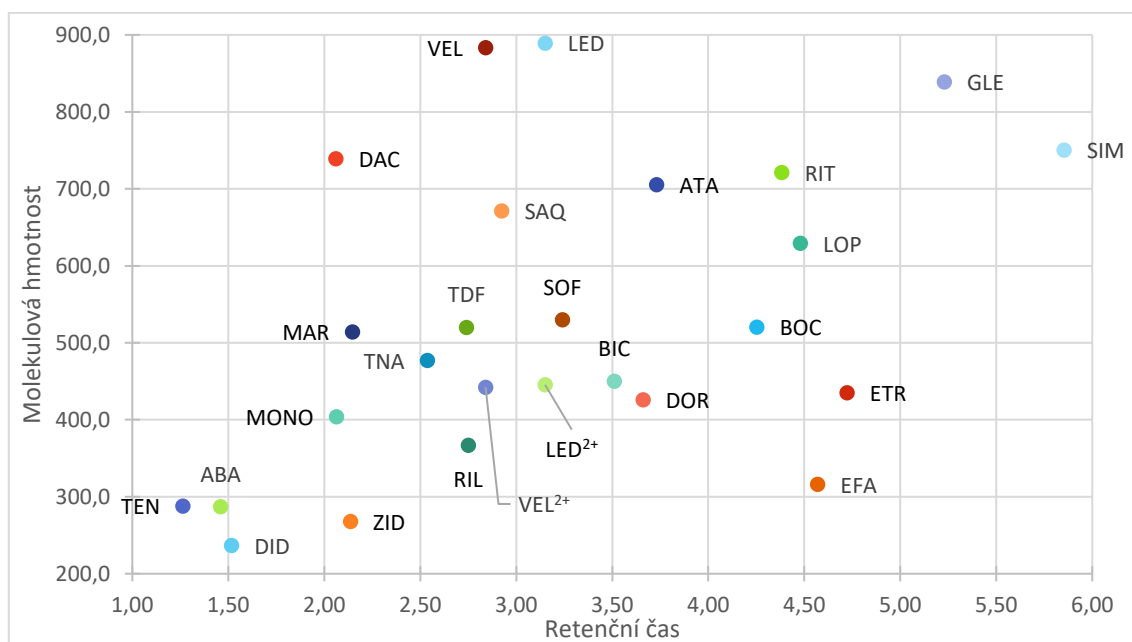
U kolony CSH fluoro-phenyl docházelo k většímu počtu koelucí v centrálním segmentu separačního okna (MONO, TDF a VEL; SAQ s TNA a RIL; ATA se SOF; BIC s DOR a BOC) v porovnání s ostatními kolonami. Kritický pár byl TDF a MONO, kde může docházet k interferencím během kvantifikace. TEN a BIC poskytovaly velmi rozmyté píky, pík RIL byl rozštěpen.

Obrázek 15: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu CSH Phenyl-hexyl.



Na koloně CSH Phenyl-hexyl nebylo dosaženo uspokojivé separace ABA a TEN (analyty s blízkým poměrem m/z) a existuje tu tedy možnost interference mezi zmíněnými látkami. BIC poskytoval rozmytý pík.

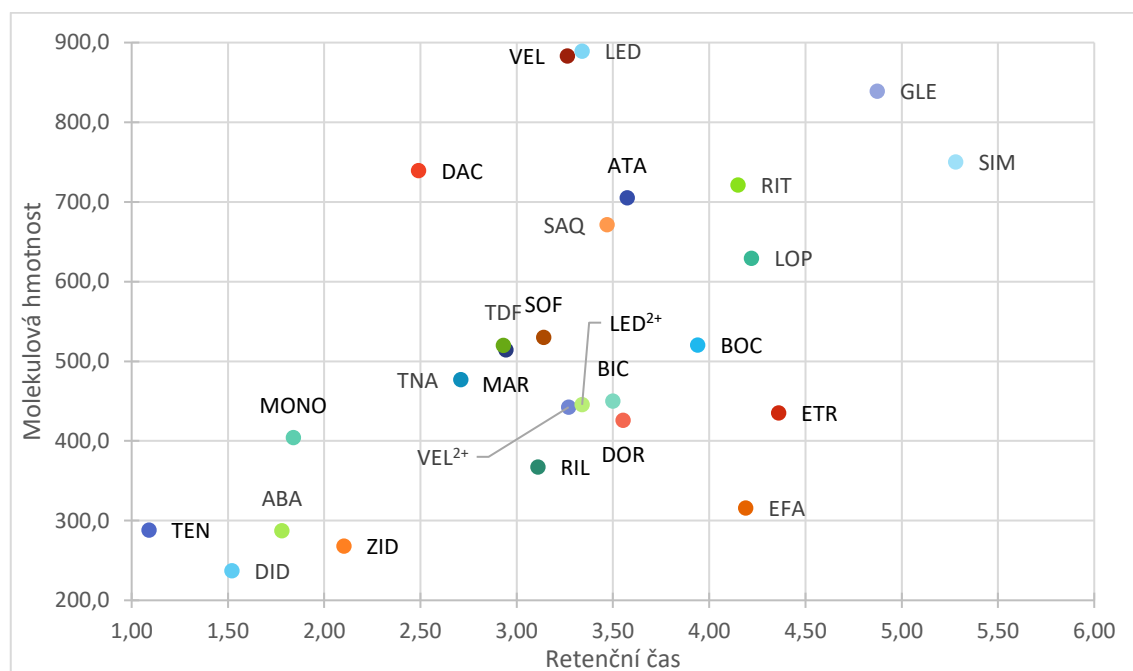
Obrázek 16: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu CSH C18.



Na koloně CSH C18 nebylo dosaženo separace DAC, MONO, MAR a ZID a dále LED a SOF a ani ABA s DID, které ovšem dokáže rozlišit MS. Může tedy být využita jako alternativa BEH

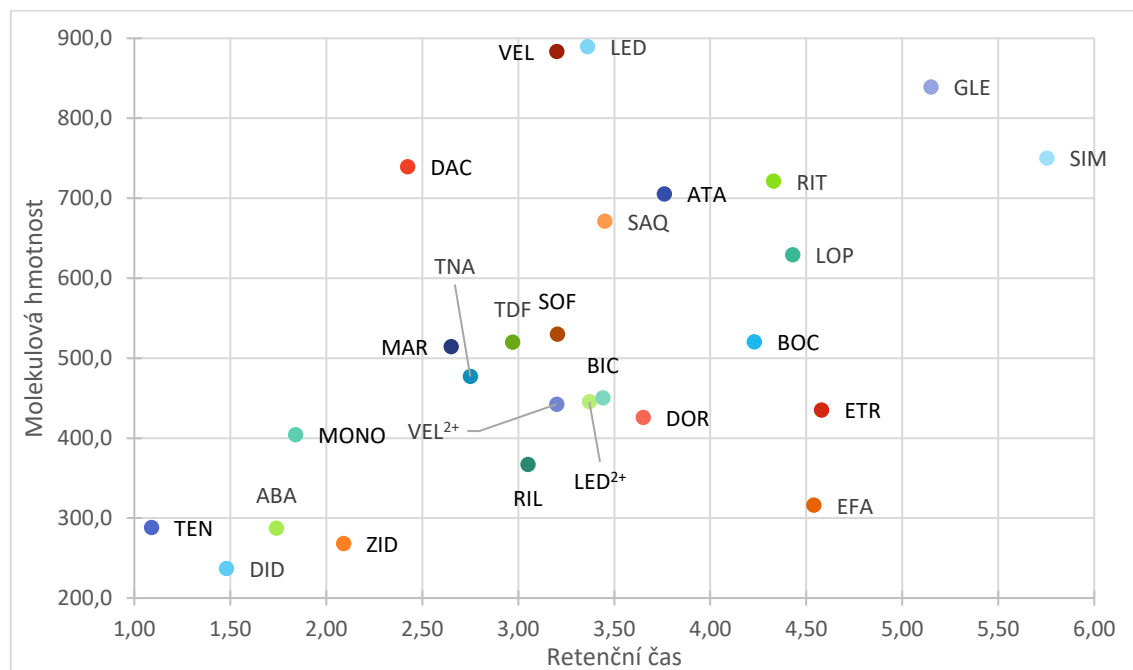
Shield RP18. U BIC docházelo k výraznému chvostování, fenoménu, který se u ostatních kolon neprojevil. TEN a BIC poskytovaly rozmyté píky.

Obrázek 17: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu BEH Phenyl.



Na koloně BEH Phenyl nebylo dosaženo separace u TDF a MAR, ani LED a VEL. Zároveň docházelo ke koeluci ABA a MONO, EFA a RIT, ATA a DOR, BIC a SAQ. Píky MAR a BIC byly výrazně rozmyté.

Obrázek 18: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu BEH C18.



Na koloně BEH C18 bylo dosaženo horší separace dvojnásobně nabitého LED a BIC v porovnání s vybranou BEH Shield RP18, mimo toho byla úspěšnost separace velmi podobná. Pík BIC byl rozmytý.

5.1.3. Optimalizace složení mobilní fáze a průtokové rychlosti v RP

Byly testovány 4 koncentrace aditiva vodné složky mobilní fáze, ze kterých byla vždy vybrána jedna pro finální srovnání. Pro výběr bylo zásadní, aby s daným aditivem všechny analyty poskytovaly signál. Dále se výběr zakládal na největším množství analytů, které při dané koncentraci aditiva poskytovaly maximální signál – shrnuty v tabulce 18, kde je v závorce vždy uveden počet analytů bez signálu. Vybraná koncentrace je označena zeleně. V případě amoniaku byl volen kompromis, který poskytne dostatečný signál v případě didanosinu (při 25 mM klesl signál na 20 %, v případě 5 mM došlo k jeho ztrátě), ostatní analyty při 10 mM poskytovaly dostatečný signál v porovnání s 5 mM a 25 mM koncentrací, ačkoli nikdy nebyl maximální.

Tabulka 18: Počet analytů poskytujících pro danou koncentraci aditiva v MF max. signál a počet analytů bez signálu.

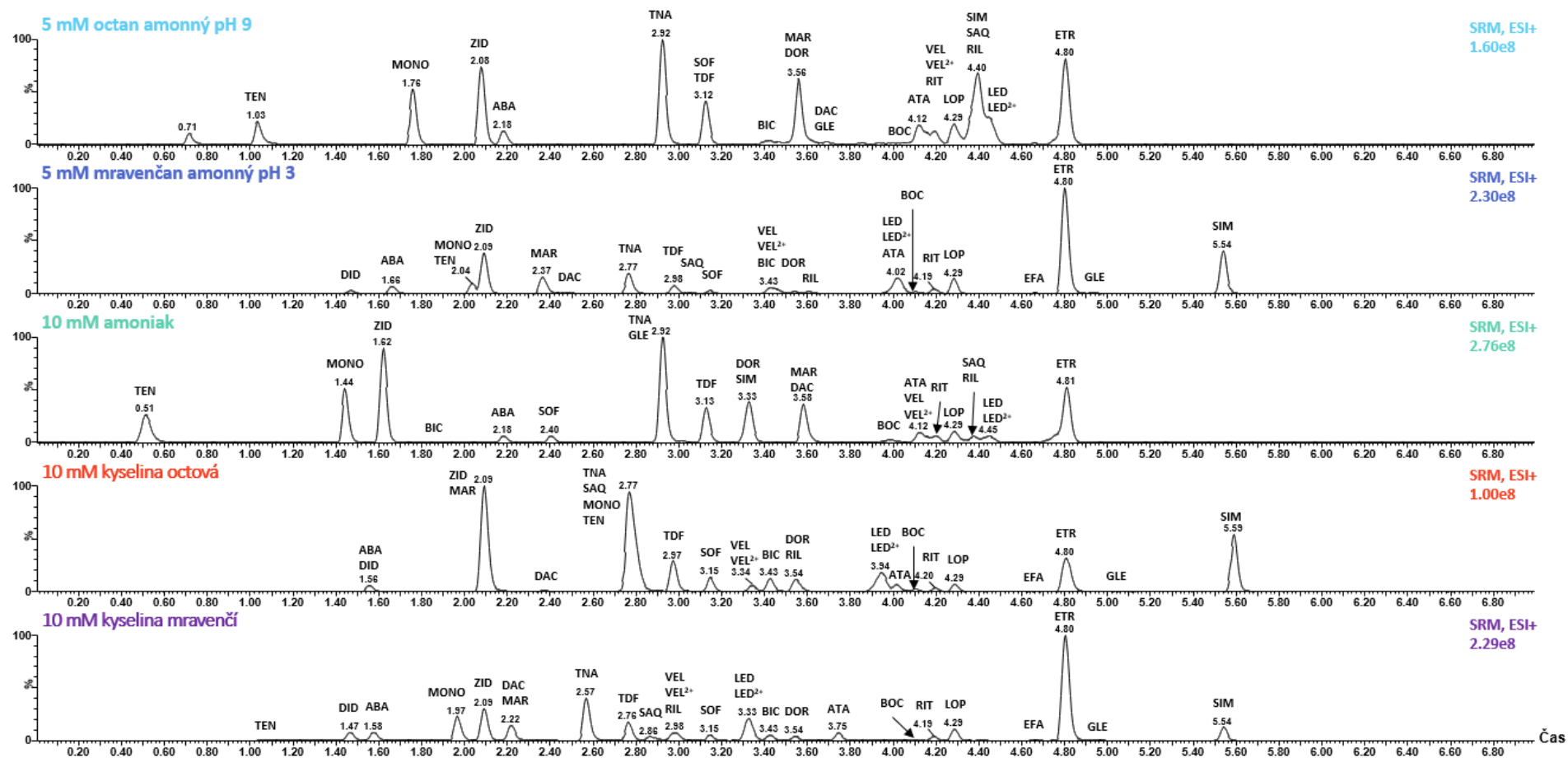
Koncentrace	Kyselina mravenčí	Kyselina octová	Amoniak	Mravenčan amonný pH 3	Octan amonný pH 9
1 mM	11 (1)	12 (1)	10 (2)	11 (0)	5 (2)
5 mM	2 (0)	0 (0)	5 (2)	12 (0)	20 (1)
10 mM	10 (0)	13 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (2)
25 mM	3 (0)	1 (0)	9 (1)	3 (0)	0 (2)

Pro objektivní porovnání bylo měřeno srovnání vybraných aditiv během jednoho dne. Jako nejvhodnější aditivum se ukázala 10 mM kyselina mravenčí. Při přidavku amoniaku a AmAc pH 9 došlo u didanosinu a efavirenu ke ztrátě signálu, v případě kyseliny octové a AmF pH 3 došlo k výraznému poklesu signálu viz tabulka 19. Z chromatogramu na obrázku 19 je patrné, že nejvhodnějším aditivem byla 10 mM kyselina mravenčí, v jejímž případě se podařilo separovat 21 píků. V případě octanu amonného pH 9 bylo separováno 16 píků, v případě mravenčanu amonného pH 3 19 píků, v případě amoniaku 15 píků, v případě kyseliny octové 18 píků.

Tabulka 19: Srovnání vlivu přidavku aditiva do mobilní fáze normalizované na vybrané aditivum – 10 mM FA.

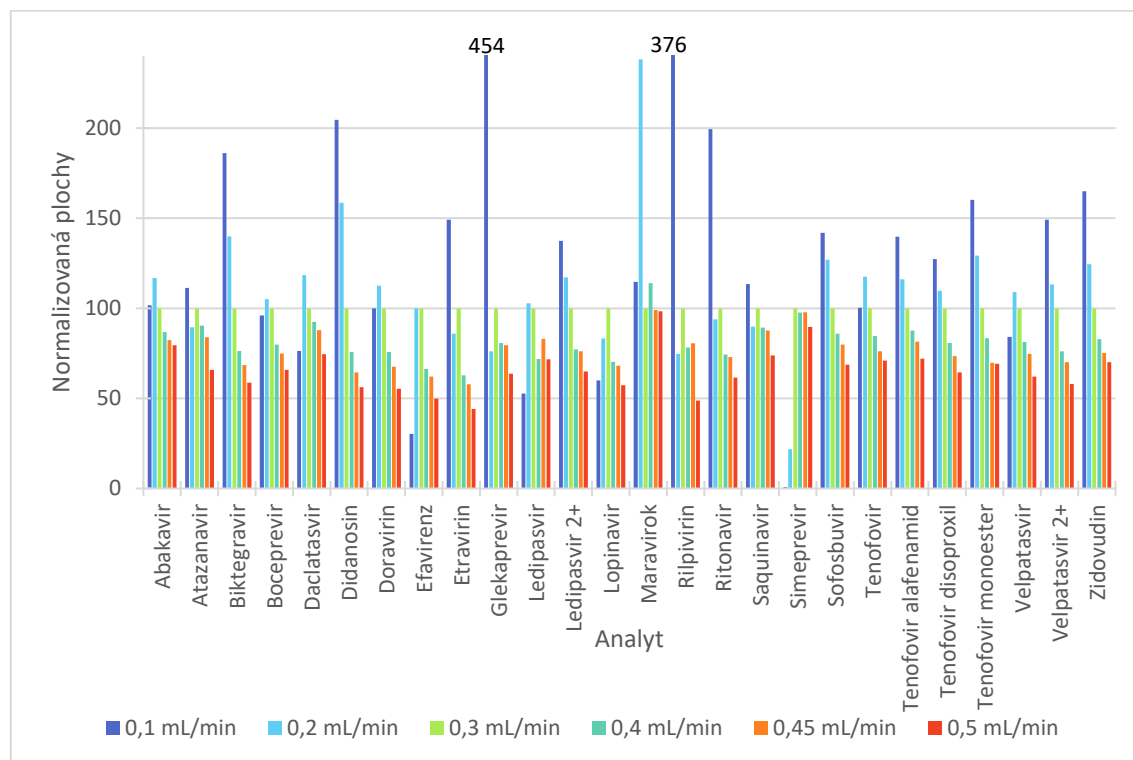
Analyt	10 mM kyselina mravenčí	10 mM kyselina octová	10 mM amoniak	5 mM mravenčan amonný pH 3	5 mM octan amonný pH 9
Abakavir	100,0	34,5	95,7	93,9	117,6
Atazanavir	100,0	33,9	128,8	67,8	149,2
Biktegravir	100,0	88,2	5,2	125,5	124,2
Boceprevir	100,0	54,6	187,7	83,6	136,3
Daclatasvir	100,0	9,5	65,5	28,7	66,0
Didanosin	100,0	0,3	0,0	33,6	0,0
Doravirin	100,0	119,3	109,1	48,3	69,6
Efavirenz	100,0	34,7	0,0	11,3	0,0
Etravirin	100,0	13,1	63,7	80,5	52,4
Glekaprevir	100,0	30,6	158,4	85,6	100,6
Ledipasvir	100,0	25,9	199,4	140,2	411,7
Ledipasvir ²⁺	100,0	47,3	60,9	55,8	94,1
Lopinavir	100,0	29,3	116,0	141,2	123,6
Maravirok	100,0	22,6	347,4	135,0	344,3
Rilpivirin	100,0	134,2	39,3	64,3	184,8
Ritonavir	100,0	36,8	152,8	106,0	168,2
Saquinavir	100,0	37,3	86,9	39,3	77,8
Simeprevir	100,0	142,9	373,2	327,6	352,2
Sofosbuvir	100,0	112,7	134,0	55,6	93,9
Tenofovir	100,0	15,6	981,6	6,3	372,9
Tenofovir alafenamid	100,0	88,5	308,0	50,1	183,0
Tenofovir disoproxil	100,0	75,5	227,5	46,7	138,9
Tenofovir monoester	100,0	108,2	263,2	46,9	162,2
Velpatasvir	100,0	16,8	128,0	52,9	202,5
Velpatasvir ²⁺	100,0	49,0	74,8	28,6	83,4
Zidovudin	100,0	146,3	347,0	124,6	169,0

Obrázek 19: Chromatogramy separace pro zkoušená aditiva přidaná do vodné složky mobilní fáze, kolona BEH Shield RP18.



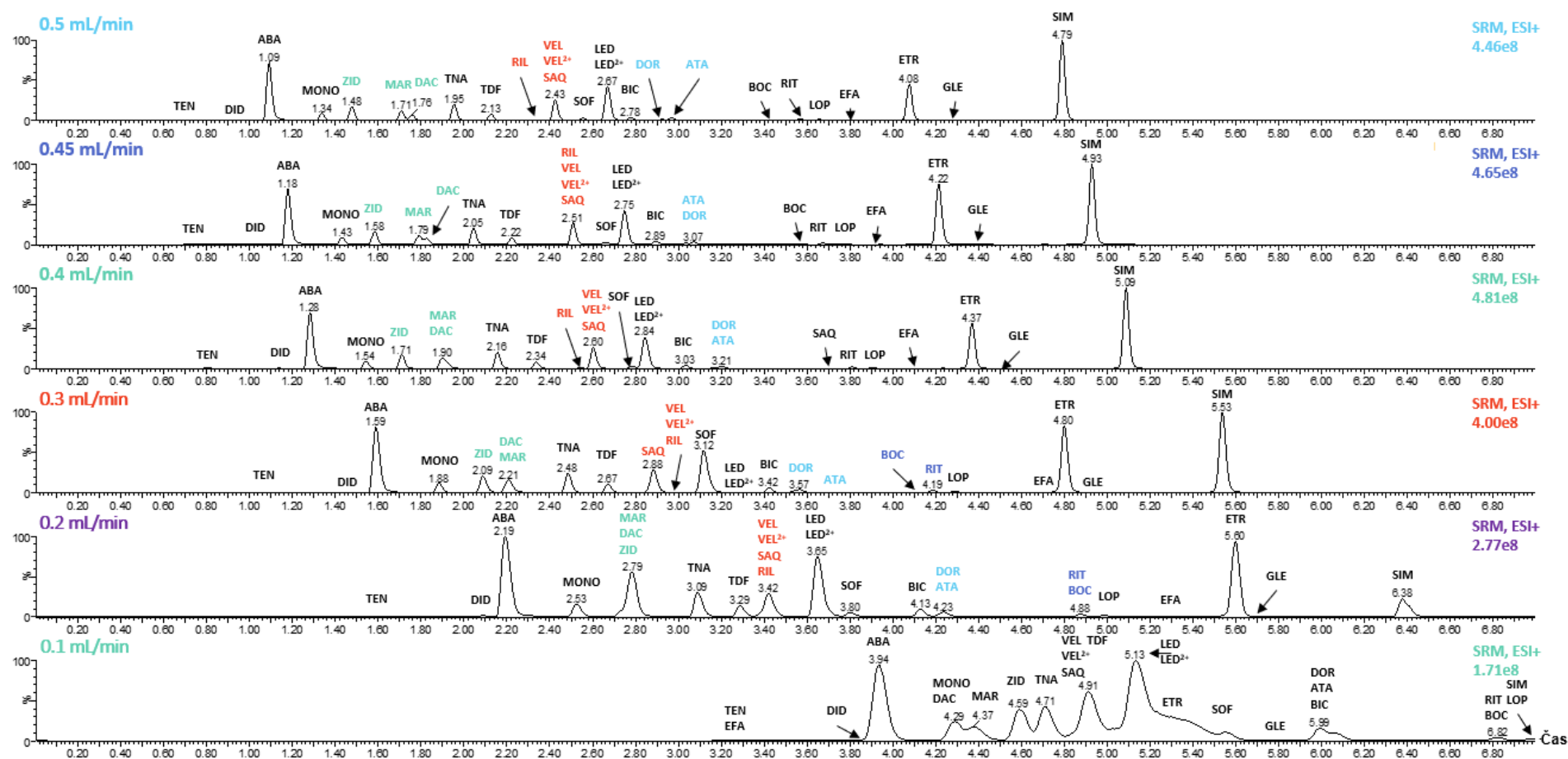
Během screeningu mobilních fází byl rovněž ověřen vliv průtoku na odezvu MS a separaci jednotlivých analytů. Byl zvolen průtok 0,3 mL/min, při kterém byly nejintenzivnější odezvy analytů, při zachování separační účinnosti (obrázek 20), zároveň byly do rozvahy zahrnuty i silně rozmyté a neostře tvary píků, které byly problematické především při průtoku 0,1 mL/min, jak je patrné z obrázku 21.

Obrázek 20: Závislost plochy píku na průtokové rychlosti normalizovaná na průtok 0,3 mL/min.



Na obrázku 21 je patrný vliv průtokové rychlosti na retenci a separační účinnost tak, jak jej popisuje van Deemterova teorie. Se zvyšujícím průtokem dochází k zúžení chromatografických píků. Zároveň dochází k poklesu jejich plochy v důsledku chromatografického ředění. Rovněž je možné si povšimnout, že zvýšení průtoku nad 0,3 mL/min nepřineslo výrazné zvýšení separační účinnosti – zvýšení počtu píků a separovaných analytů v chromatogramu, naopak při průtoku 0,4 mL/min a 0,45 mL/min docházelo ke smývání doravirinu, atazanaviru a velpatasviru, rilpivirinu, saquinaviru. Při průtoku 0,2 mL/min bylo separováno 18 píků, v průtoku 0,3 mL/min 21 píků, při průtoku 0,4 mL/min 20 píků, při průtoku 0,45 mL/min 20 píků a při průtoku 0,5 mL/min 20 píků. V obrázku 21 jsou barevně označené kritické páry, u kterých došlo ke zlepšení či zhoršení separace. Nejlepší separace bylo dosaženo při průtoku 0,3 mL/min a 0,5 mL/min. Při porovnání těchto dvou je dosaženo lepší separace DOR a ATA v případě průtoku 0,3 mL/min. I v tomto případě byl tedy jako nejvhodnější průtok vyhodnocen průtok 0,3 mL/min.

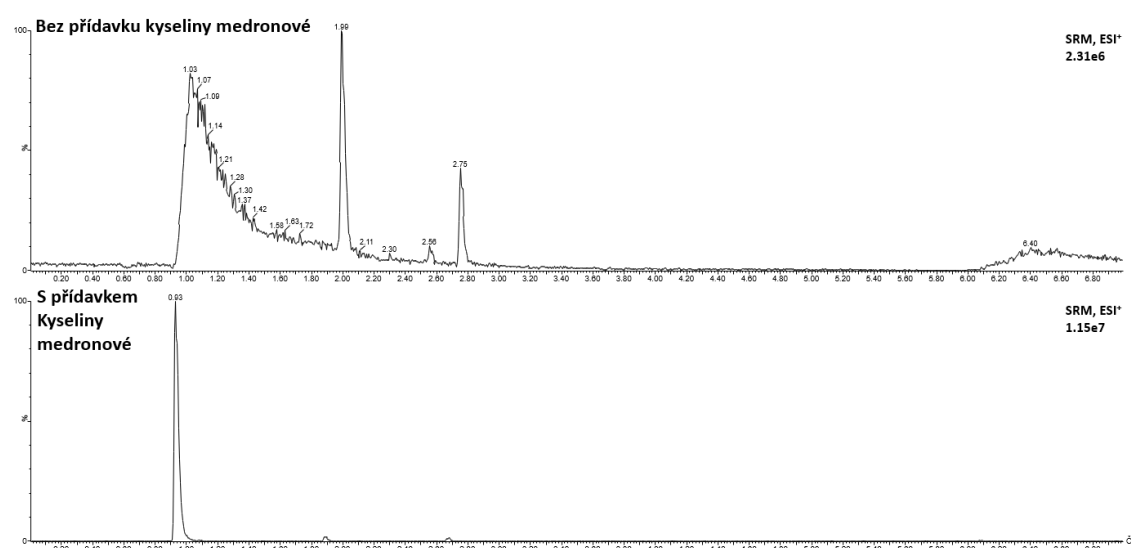
Obrázek 21: Vliv průtokové rychlosti na retenci a separační účinnost, kolona BEH Shield RP18, MF 10 mM kyselina mravenčí/ACN.



Kyselina medronová vykazuje schopnost vyvazovat stopové množství kovů v chromatografickém systému, které negativně ovlivňují tvar píku především v módu HILIC, vliv je ovšem patrný i v RP. Na přítomnost stopových množství kovů jsou citlivé především fosforylované látky a karboxylové kyseliny. Vzhledem k tomu, že tenofovir je fosforylován, je pro něj přítomnost kovů velmi kritický parametr. Kyselinu medronovou je možné použít pro analýzy v pozitivním i negativním módu s žádným, či minimálním potlačením signálu [74].

Do obou složek mobilní fáze bylo přidáno 0,1 % kyseliny medronové. Látkou citlivou na přítomnost stopových množství kovů byl ve vyvíjené multimetodě pouze tenofovir (kvůli terminální fosforylaci), u ostatních látek se vliv neprojevil. Srovnání tvaru píku tenofovirovi před a po přidavku kyseliny medronové je na obrázku 22. Pro ostatní látky se vliv přidavku na tvar píku ani retenci neprojevil.

Obrázek 22: Vliv přidavku kyseliny medronové na tvar píku tenofovirovi v RP.



5.1.4. Vliv rozpouštědla vzorku v systému reverzních fází

Byl proveden screening rozpouštědel vzorku. Testovány byly acetonitril ve vodě, methanol ve vodě a acetonitril v methanolu v daných poměrech (viz 4.4.5.). V rámci jednotlivých rozpouštědel byl posuzován vliv na odezvu a vliv na separaci a tvary píků.

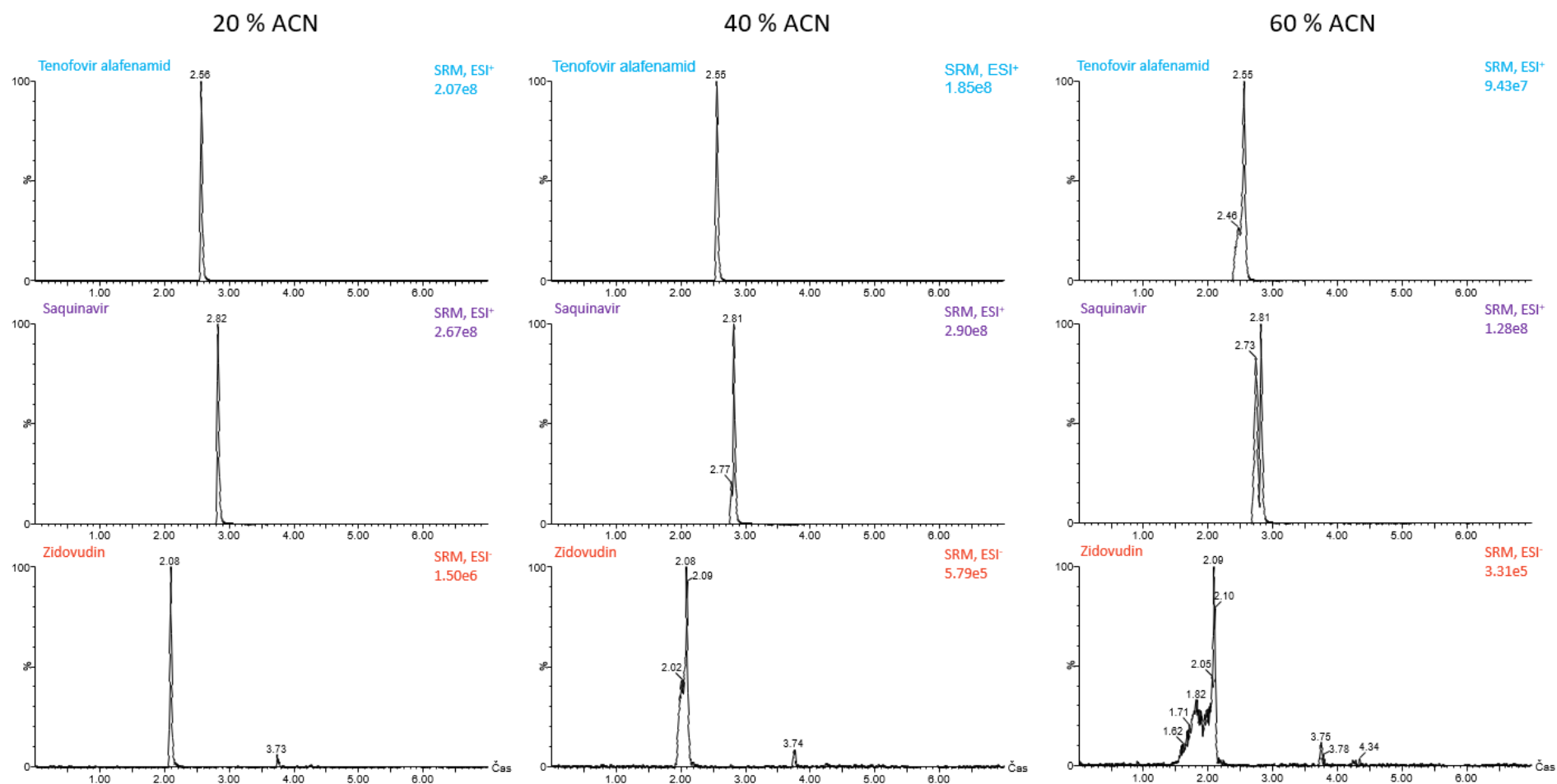
V případě acetonitrilu bylo dosaženo nejlepší odezvy při 20 % - 60 % ACN ve vodě bez výrazného vlivu na separaci. Vzhledem k tvarům píků u SAQ, TNA a ZID byla zvolena jako nejvhodnější varianta 20 % ACN, kdy dosažené odezvy pro drtivou většinu analytů neměly daleko k maximu a byly zachovány symetrické tvary píků. Analyty, u kterých se vliv na tvar píku projevil jsou na obrázku 23.

Při použití methanolu jako rozpouštědla vzorku bylo dosaženo nejvíce maximálních odezev při 40 % MeOH ve vodě. S přihlédnutím k chromatografii se ovšem stále jeví jako lepší varianta použití 20 % ACN. V případě 40 % MeOH došlo ke zhoršení separace TDF, SAQ, VEL a RIL, viz obrázek 24.

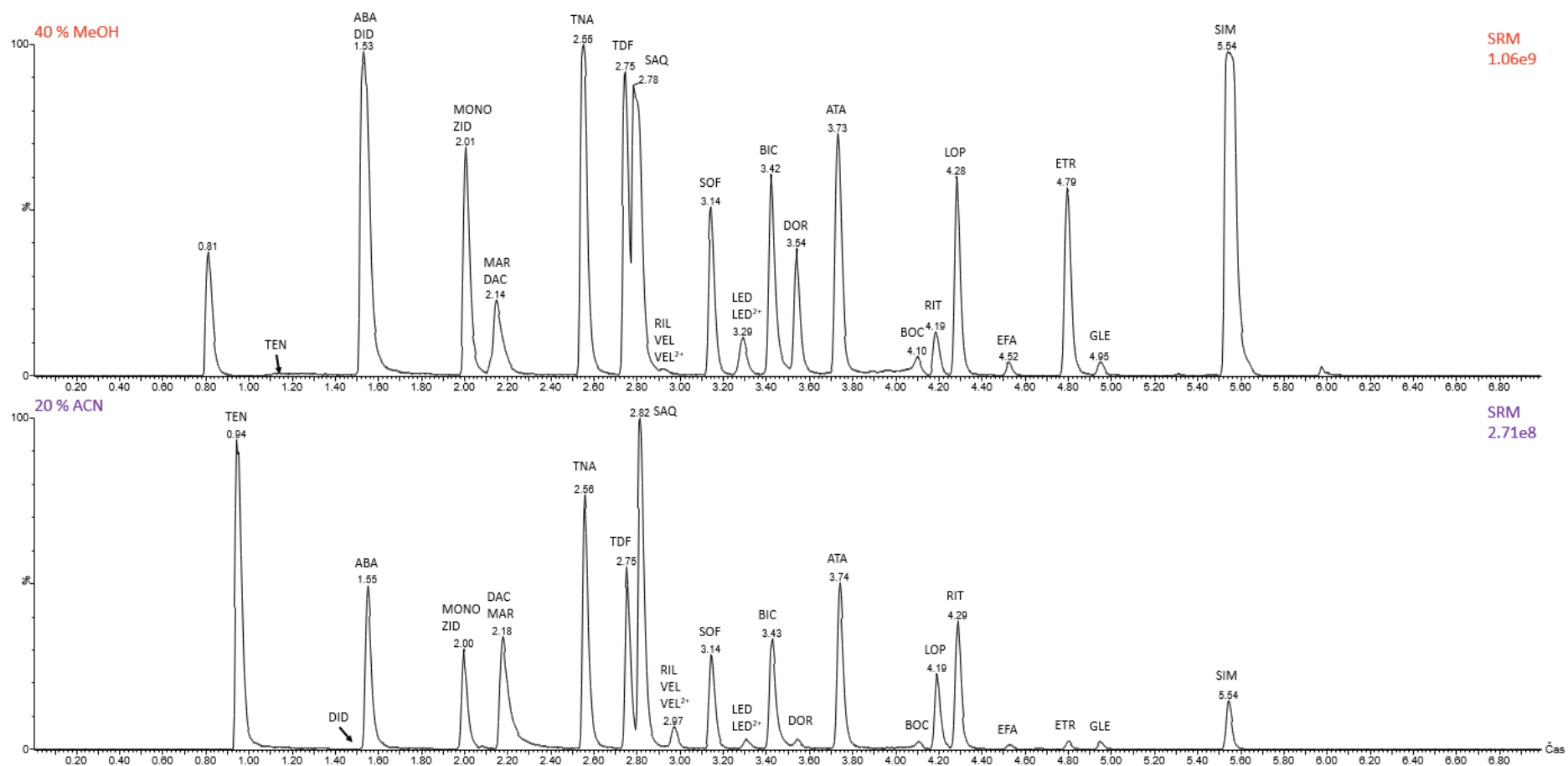
Pro odezvu se v případě různých poměrů ve směsi acetonitrilu a methanolu neprojevil zásadní vliv. Jak se dalo očekávat, byly do značné míry ovlivněny tvary píků, které se ve všech případech rozmývaly, což velmi výrazně zhoršilo kapacitu separace.

Z výše popsaných důvodů byl jako nejvhodnější rozpouštědlo vzorku zvolen 20 % ACN.

Obrázek 23: Vliv % ACN ve vodě jako rozpouštědla vzorku na tvar píku TNA, SAQ, ZID.



Obrázek 24: Srovnání vlivu 20 % ACN a 40 % MeOH jako rozpouštědla vzorku na separaci.



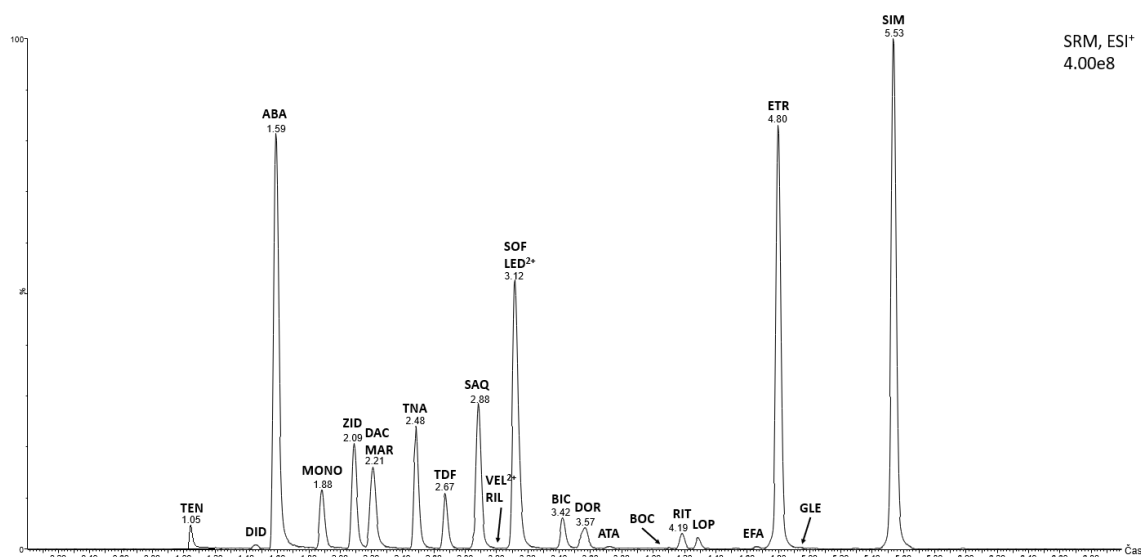
5.1.5. Souhrn optimalizovaných podmínek pro metodu na reverzních fázích

V tabulce 20 jsou shrnuty optimalizované parametry reverzně fázové metody. Na obrázku 25 je chromatogram separace za finálních podmínek a na obrázku 26 záznamy jednotlivých SRM přechodů.

Tabulka 20: Souhrn optimalizovaných podmínek pro RP metodu.

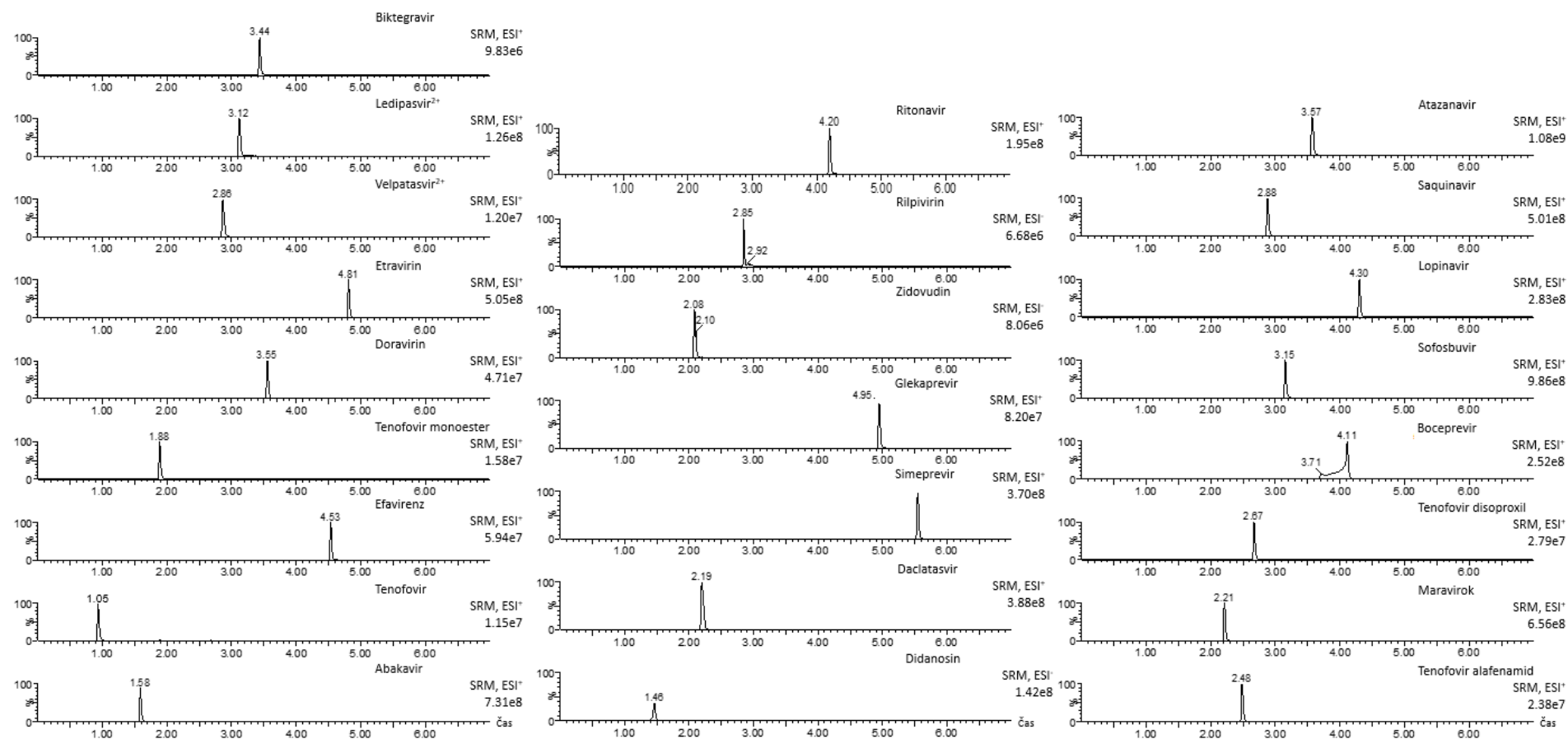
Parametr	Nastavení parametru	
Kolona	BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm)	
Mobilní fáze	10 mM kyselina mravenčí + 0,1 % kyselina medronová	ACN + 0,1 % kyselina medronová
Průtoková rychlost	0,3 mL/min	
Gradientová eluce	5 % ACN – 98 % ACN, během 5 minut	
Nastřikovaný objem	2 µL	
Teplota kolony	40°C	
Teplota dávkovače vzorku	10°C	
Silná oplachová kapalina	ACN	
Slabá oplachová kapalina	10 % ACN	
Rozpouštědlo vzorku	20 % ACN	

Obrázek 25: Chromatogram separace látek za optimalizovaných podmínek reverzně fázové metody.



Na obrázku 26 jsou u všech analytů patrné úzké symetrické píky. Jedinou výjimkou je boceprevir, jehož pík je rozmytý. K tomuto jevu v různé míře docházelo u všech testovaných mobilních fází s výjimkou amoniaku. Příčinou tedy pravděpodobně bude vliv pH na interakci bocepreviru se stacionární fází.

Obrázek 26: Jednotlivé SRM přechody získané při podmínkách optimalizované reverzně fázové metody.



5.2. Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody

5.2.1. Ověření výsledků optimalizace MS metody v módu RP pro mód HILIC

Při ověření optimalizace došlo oproti optimalizovaným podmínkám v RP ke změnám u napětí na kapiláře a napětí na vstupním kuželu. Ostatní parametry zůstaly identické s metodou RP. Pro napětí na kapiláře došlo v pozitivním módu ke změně z 1,0 kV na 2,0 kV. Pro negativní mód se jako nejvhodnější ukázalo napětí 2,5 kV, oproti 1,5 kV použitému v RP. Pro napětí na vstupním kuželu jsou výsledky v tabulce 21. V negativním módu ke změnám v napětí nedošlo.

Tabulka 21: Změny získané při optimalizaci napětí na vstupním kuželu v pozitivním módu.

Analyt	CV pozitivní mód RP [V]	CV pozitivní mód HILIC [V]	Analyt	CV pozitivní mód RP [V]	CV pozitivní mód HILIC [V]
Biktegravir	15	55	Ledipasvir	15	65
Doravirin	40	55	Tenofovir monoester	15	45
Efavirenz	20	30	Zidovudin	15	20
Etravirin	10	65			

V případě tlaku zmlžujícího plynu, průtoku plynu na vstupním kuželu, průtoku desolvatačního plynu a desolvatační teploty ke změnám optimalizovaných hodnot nedošlo.

5.2.1.1. Srovnání citlivosti pozitivního a negativního módu v HILIC

Na základě porovnání spodního limitu kvantifikace a lineárního rozsahu byly pro didanosin, rilpivirin, a zidovudin zvoleny optimalizované SRM přechody v negativním módu (v tabulce 22 označeny zeleně), analogicky jako v módu RP.

Tabulka 22: Souhrn údajů lineární regrese v pozitivním a negativním módu v HILIC.

Analyt	Pozitivní mód			Negativní mód		
	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient
Abakavir	0,001	0,5	0,99593	Neionizuje		
Atazanavir	0,001	0,5	0,99878	Neionizuje		
Biktegravir	0,05	0,5	0,99572	n/a		
Boceprevir	0,005	0,5	0,99615	0,02	0,5	0,99904
Daclatasvir	0,005	0,5	0,99840	0,02	0,5	0,99871
Didanosin	n/a			0,001	5	0,99883
Doravirin	0,001	0,5	0,99922	0,01	0,5	0,99661
Efavirenz	0,001	5	0,99913	Neionizuje		
Etravirin	0,01	0,5	0,97706	0,1	0,5	0,99439
Glekaprevir	0,005	0,5	0,99359	0,005	0,5	0,99862
Ledipasvir	0,005	0,5	0,99728	0,05	0,5	0,99635
Ledipasvir ²⁺	0,002	0,5	0,99812	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion		
Lopinavir	0,002	0,5	0,99573	0,01	0,5	0,99343
Maravirok	0,001	0,5	0,99783	0,05	0,5	0,99185
Rilpivirin	0,005	0,5	0,99435	0,001	0,5	0,99831
Ritonavir	0,002	0,5	0,99616	0,02	0,5	0,98355
Saquinavir	0,0005	0,5	0,99936	0,001	0,5	0,99961
Simeprevir	0,0002	0,5	0,99895	0,01	0,5	0,99900
Sofosbuvir	0,001	0,5	0,99798	0,005	0,5	0,99826
Tenofovir	n/a			n/a		
Tenofovir alafenamid	0,002	0,5	0,99824	0,005	0,5	0,99171
Tenofovir disoproxil	0,002	0,5	0,99648	Neionizuje		
Tenofovir monoester	0,02	0,5	0,99621	0,1	0,5	0,99323
Velpatasvir	0,01	0,5	0,99861	0,02	0,5	0,99639
Velpatasvir ²⁺	0,01	0,5	0,99684	Neposkytuje dvojnásobně nabitý ion		
Zidovudin	0,05	0,5	0,99704	0,005	0,5	0,995339

5.2.2. Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze v HILIC

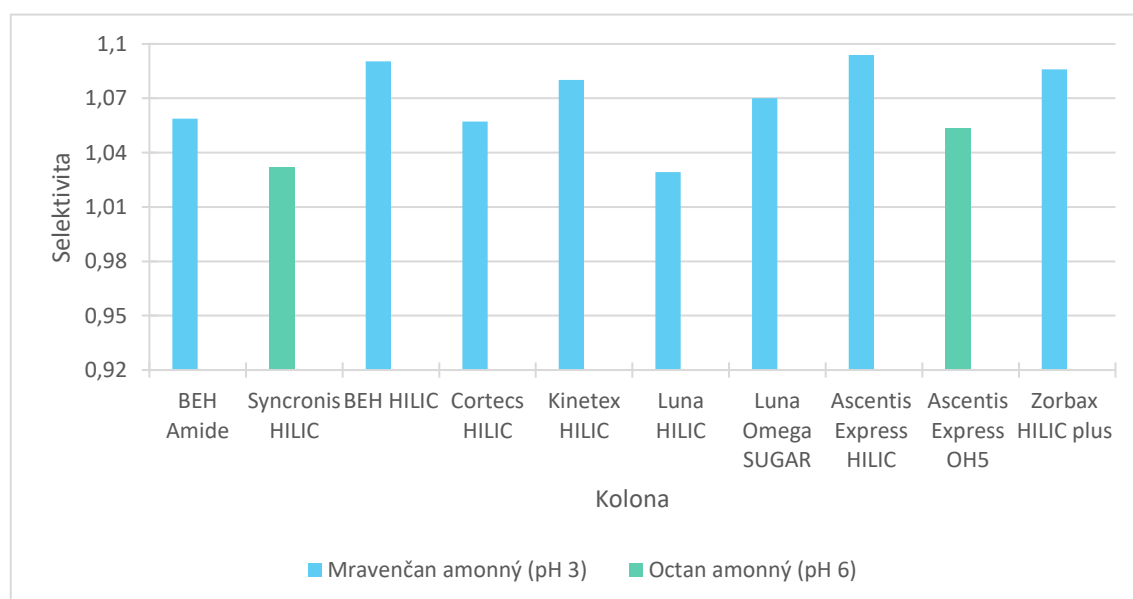
Pro každou z kolon byly testovány 4 vodné složky mobilní fáze ve dvou koncentracích. Testována byla kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný pH 3 a octan amonný pH 6 v koncentracích 10 mM a 25 mM. V případě kyselin píky zpravidla výrazně chvostovaly – pufrý poskytovaly užší, nerozmyté a symetrické píky. Zároveň v případě kyselin píky nikdy nebyly odděleny lépe než v případě pufrů – pufrý poskytovaly lepší selektivitu a rozlišení. Vyšší signál, až na výjimky, poskytovala více koncentrovaná aditiva, mimo to byla více koncentrovaná aditiva úspěšnější i v rámci separace a poskytovala vyšší selektivitu. Pro finální porovnání byla vybrána jedna koncentrace vodné složky mobilní fáze podle výše popsaných parametrů pro každou kolonu – viz tabulka 23, vybrané koncentrační úrovně jsou označeny zeleně.

Tabulka 23: Výběr koncentrace vodné složky mobilní fáze v HILIC.

Kolona	Kyselina mravenčí	Kyselina octová	Mravenčan amonný (pH 3)	Octan amonný (pH 6)
BEH Amide	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Synchronis HILIC	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
BEH HILIC	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Cortecs HILIC	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Kinetex HILIC	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Luna HILIC	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Luna Omega SUGAR	10 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Ascentis Express HILIC	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
Ascentis Express OH5	25 mM	10 mM	25 mM	25 mM
Zorbax HILIC Plus	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM

Z vypočtených selektivit byl sestaven obrázek 27. Nejvyšších průměrných hodnot selektivity vypočtených z retenčního času pro vrchol píky bylo dosaženo na kolonách BEH HILIC, Ascentis Express HILIC a Zorbax HILIC plus. Kolona BEH HILIC, jejíž hodnota selektivity byla nejvyšší však poskytovala široké píky, a tím pádem více koelucí.

Obrázek 27: Průměrná selektivita pro jednotlivé kolony s vybranými MF v HILIC.



Dále byly u vybraných koncentrací vodných složek mobilních fází posuzovány chromatogramy jako takové. Sledován byl počet zcela separovaných píků na chromatogramu, počet zcela separovaných látek (látky separované až na základní linii), počet látek koeluuujících (2

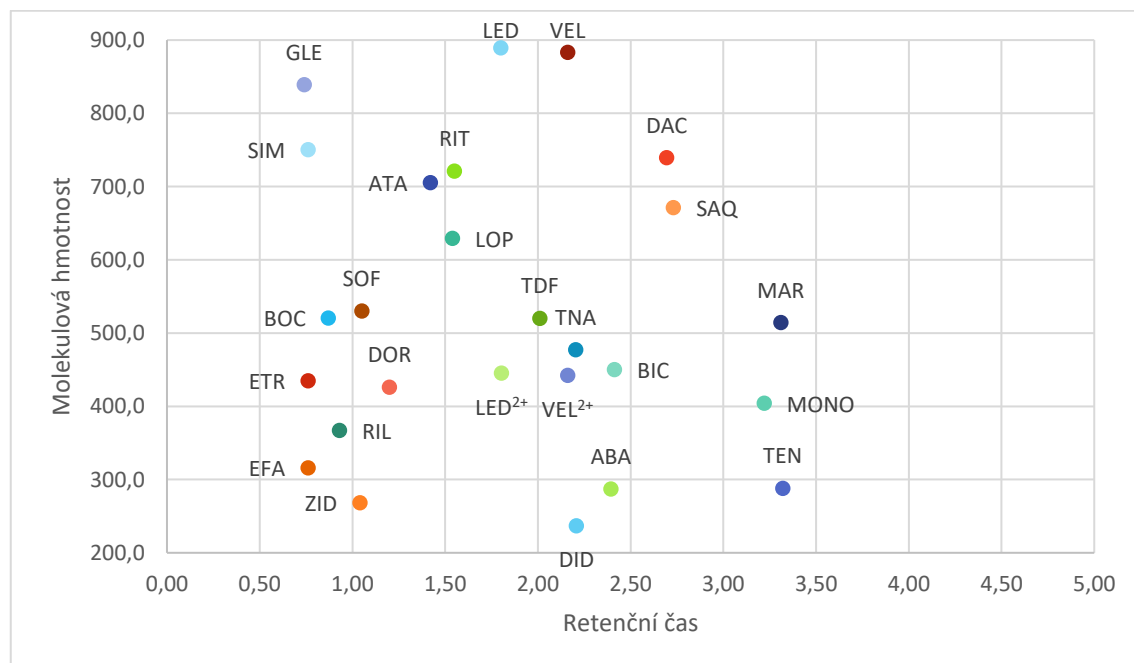
a více látek v 1 píku) a počet látek částečně koeluuujících (nedokonale rozlišené píky). Z výsledných počtů byla vytvořena tabulka 24. Jako velmi nadějně se ukázaly kolony BEH HILIC, Cortecs HILIC a Ascentis Express HILIC, v tabulce 24 označené zeleně, které umožnily separaci nejvyššího počtu látek. Ve všech případech se jedná o zástupce skupiny kolon plněných čistým silikagelem. Kolony plněné SF typu modifikovaných silikagelů byly méně úspěšné – bylo pozorováno více koelucí a méně samostatně separovaných látek i méně píků na chromatogramu.

Tabulka 24: Úspěšnost separace pro mobilní fáze označené zeleně v tabulce 23.

Kolona	Počet píků na chromatogramu	Počet samostatně separovaných látek	Počet koeluuujících látek	Počet částečně koeluuujících látek
BEH Amide	14	3	15	5
Synchronics HILIC	12	2	19	2
BEH HILIC	17	2	12	9
Cortecs HILIC	16	6	11	5
Kinetex HILIC	14	3	16	5
Luna HILIC	14	1	13	9
Luna Omega SUGAR	12	2	18	3
Ascentis Express HILIC	16	7	15	3
Ascentis Express OH5	15	4	15	3
Zorbax HILIC Plus	14	4	16	3

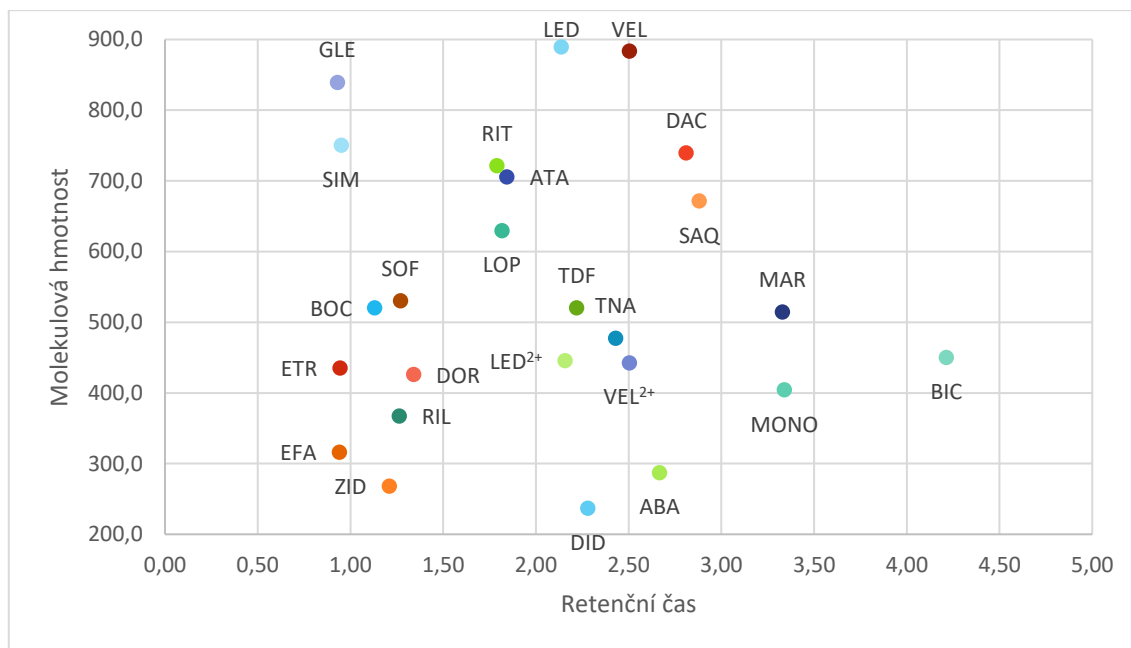
Na obrázku 28 – 31 jsou zobrazeny závislosti m/z na retenčním čase pro kolony vybrané na základě předešlých parametrů. Ascentis Express HILIC v porovnání s ostatními kolonami poskytuje nejlepší separaci ATA a RIT. Ačkoli je separace v HILIC na první pohled horší než v RP, nejedná se o problém, protože sledované analyty je možno rozlišit pomocí MS.

Obrázek 28: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu Ascentis Express HILIC s 25 mM AmF pH 3/ACN jako MF.



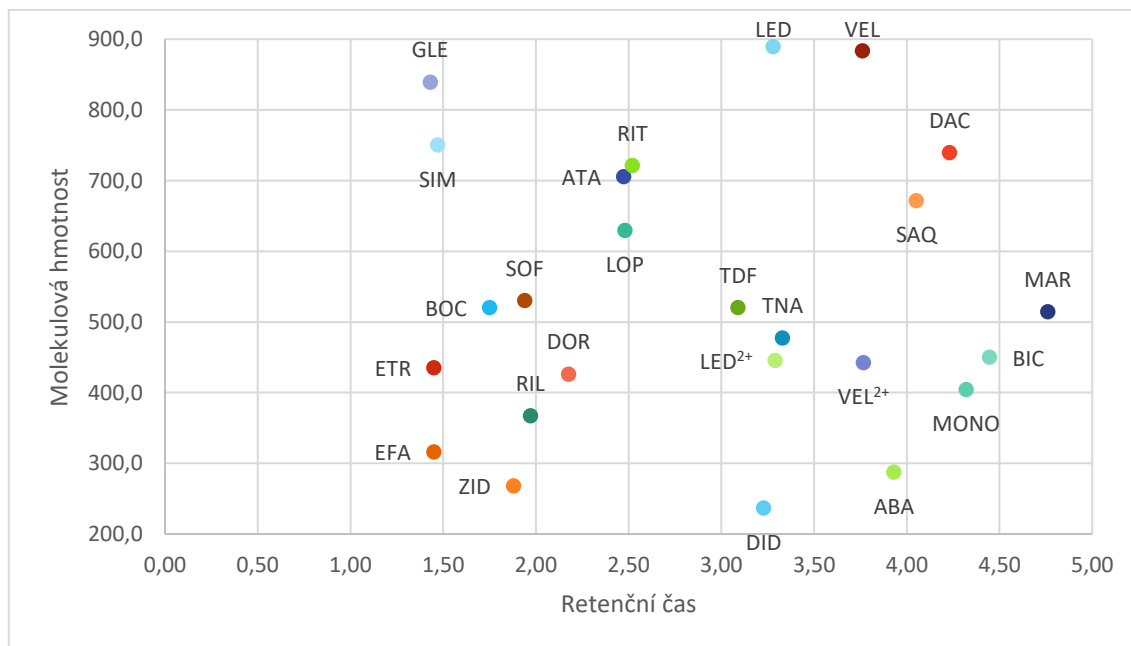
Na koloně Ascentis Express HILIC bylo dosaženo lepší separaci analytů relativně blízkého m/z – RIT a ATA. Zároveň poskytuje vyšší selektivitu a ostřejší píky v porovnání s ostatními hodnocenými kolonami.

Obrázek 29: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu BEH HILIC s 25 mM AmF pH 3/ACN jako MF.



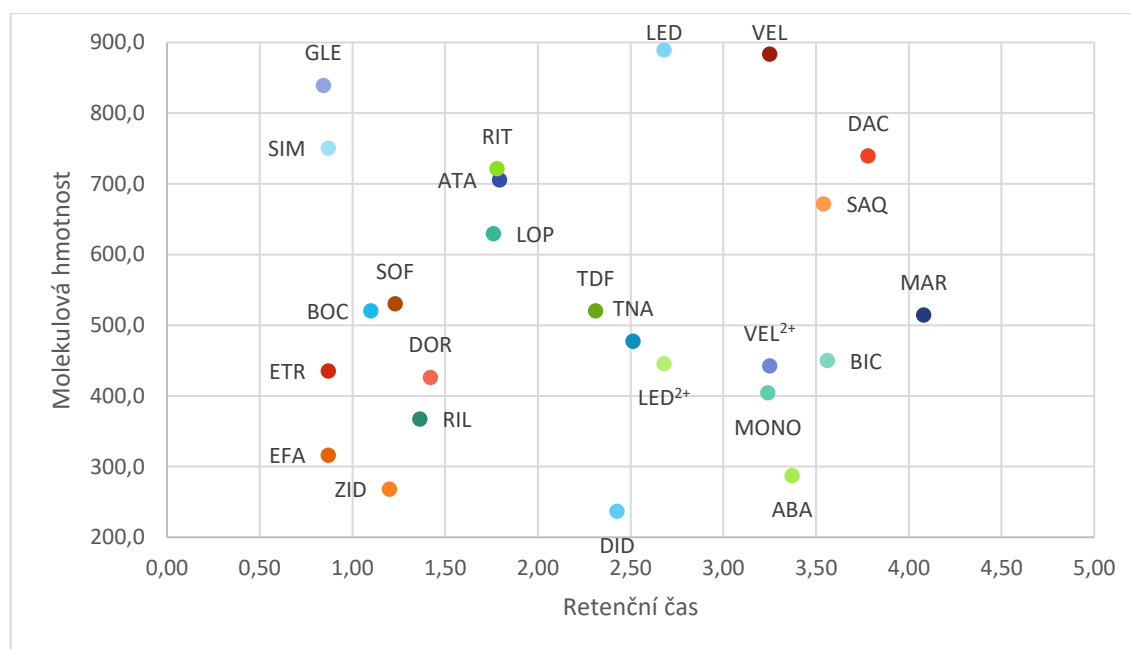
Na koloně BEH HILIC je možné pozorovat nižší rozlišení mezi RIT a ATA v porovnání s Ascentis Express HILIC. Zároveň je možné pozorovat daleko větší množství koelucí než v případě ostatních posuzovaných kolon – viz obrázek 32.

Obrázek 30: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu Cortecs HILIC s 25 mM AmF pH 3/ACN jako MF.



Na koloně Cortecs HILIC bylo dosaženo separace srovnatelné s Ascentis Express HILIC, co do počtu píků, zároveň však bylo dosaženo horší rozlišení RIT a ATA. Rovněž je možné pozorovat širší píky, což vede k horšímu rozlišení jednotlivých analytů, a tím k horší selektivitě. Píky chvostují, což má za následek další zhoršení selektivity.

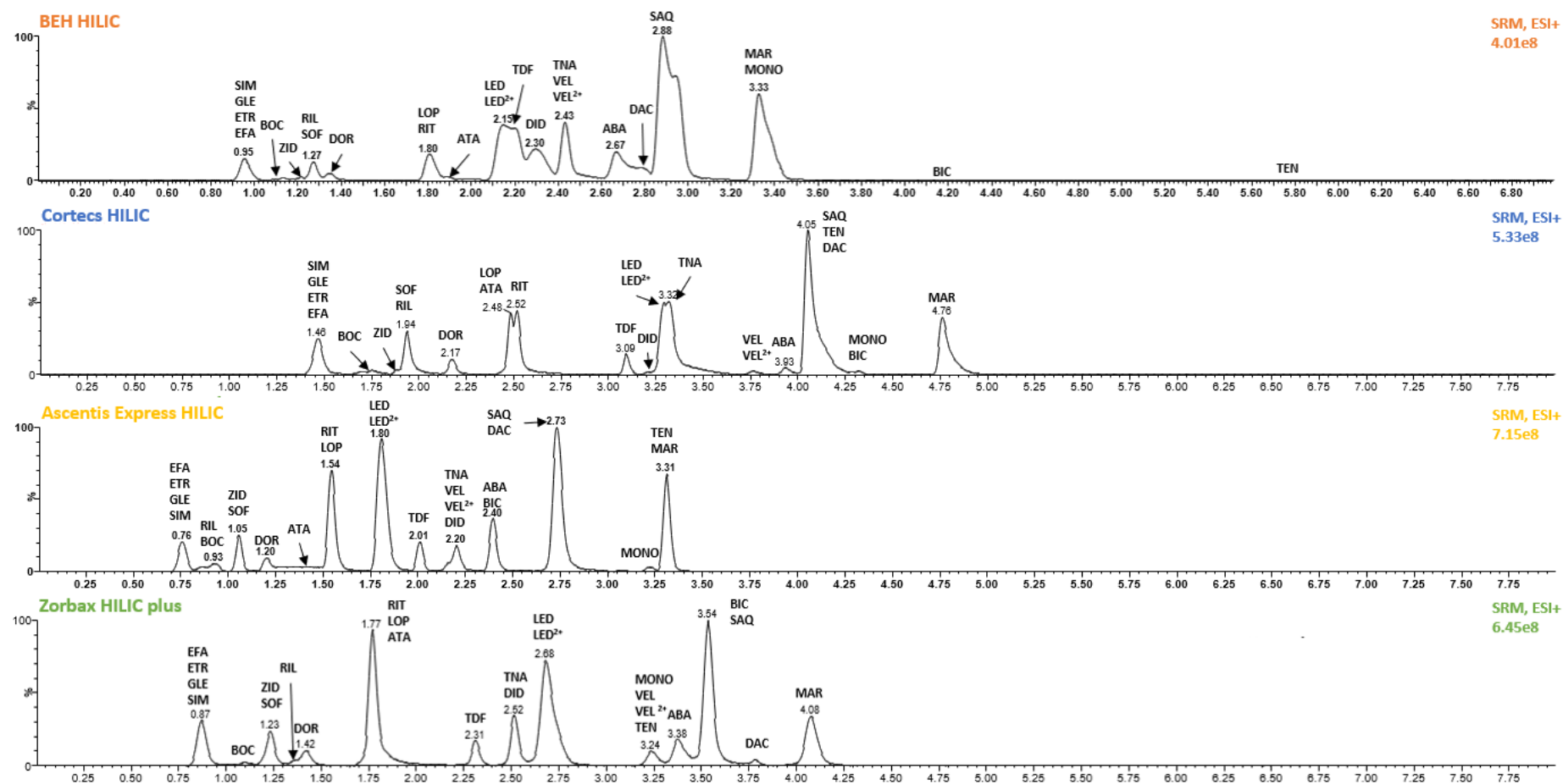
Obrázek 31: Závislost m/z na retenčním čase pro kolonu Zorbax HILIC plus s 25 mM AmF pH 3/ACN jako MF.



Na koloně Zorbax HILIC plus jsou pozorovatelné široké píky a v porovnání s ostatními kolonami i více koelucí.

Na obrázku 32 jsou zobrazeny chromatogramy pro výše vybrané kolony s příslušnými výše vybranými mobilními fázemi. Při srovnání dvou nejnadějnějších kolon vybraných na základě předchozích hodnocení (tj. BEH HILIC a Ascentis Express HILIC) dosahuje lepší separace Ascentis Express HILIC právě kvůli užším a lépe rozlišeným píkům.

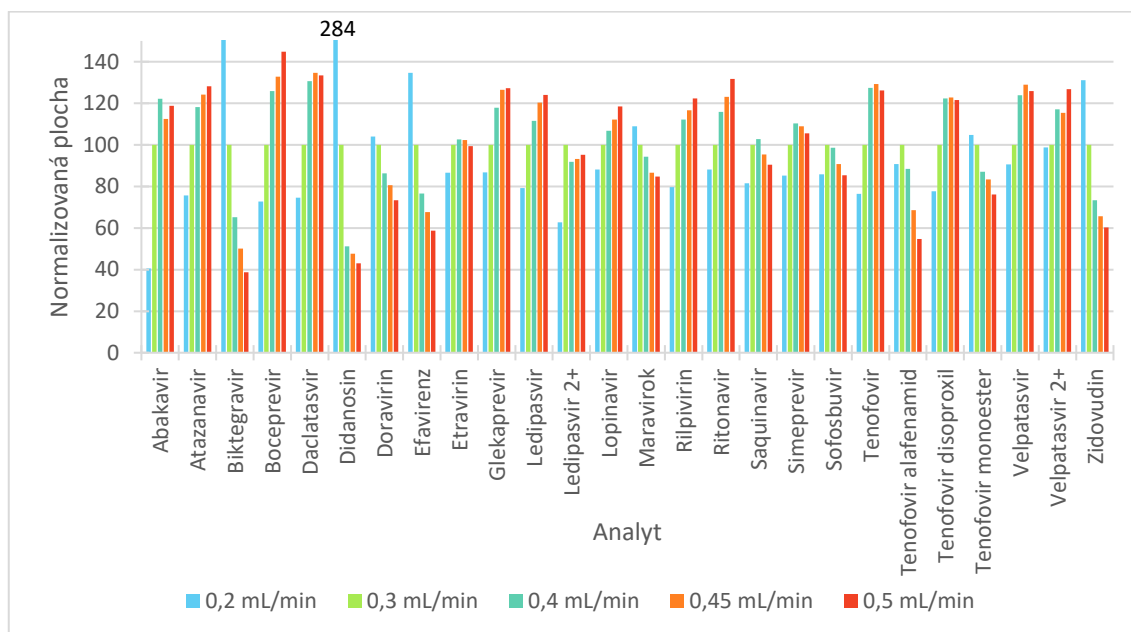
Obrázek 32: Srovnání chromatogramů vybraných kolon.



5.2.3. Optimalizace průtokové rychlosti a nastavení gradientové eluce v HILIC

Byla optimalizována průtoková rychlost. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 33. Mezi analyty se zpravidla vyskytují dva trendy, s rostoucí průtokovou rychlostí odezva klesá a s rostoucí průtokovou rychlostí odezva roste. Zároveň bylo přihlédnuto k úspěšnosti separace při jednotlivých průtocích. Z těchto důvodů byla jako kompromis zvolena střední průtoková rychlost 0,3 mL/min, při které poskytovaly analyty odezvy a adekvátní separaci ve všech případech.

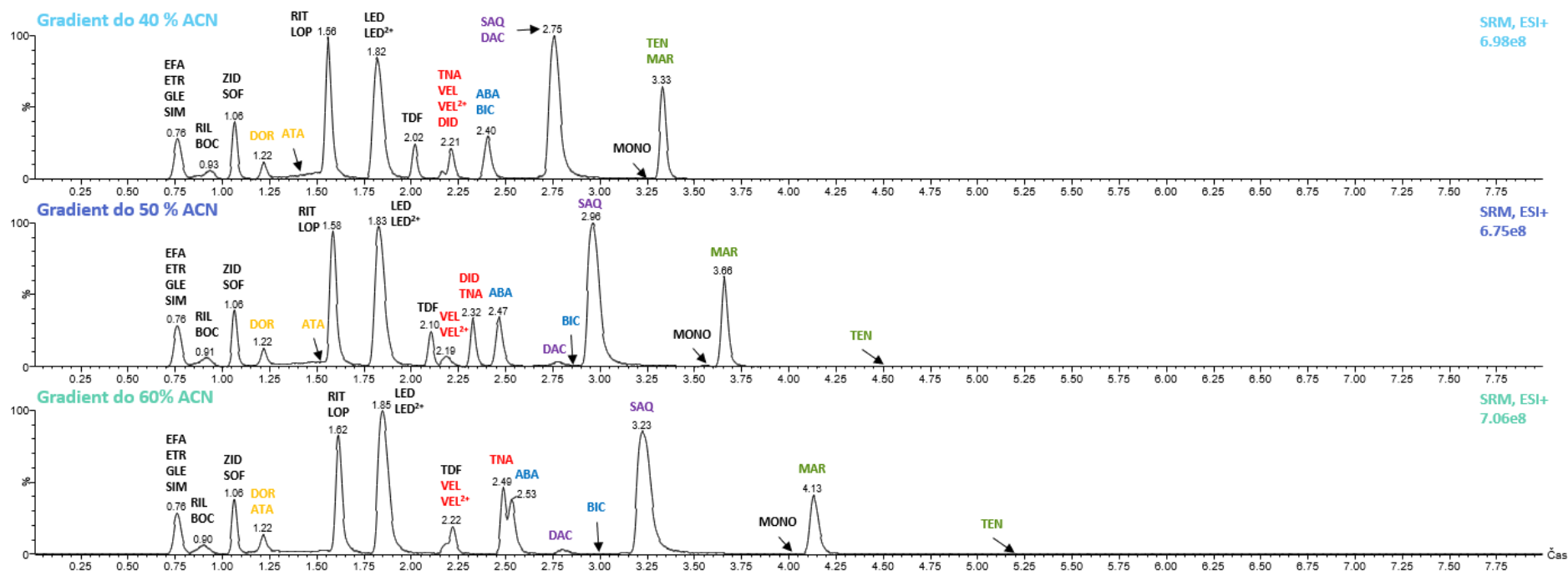
Obrázek 33: Závislost plochy píku na průtokové rychlosti.



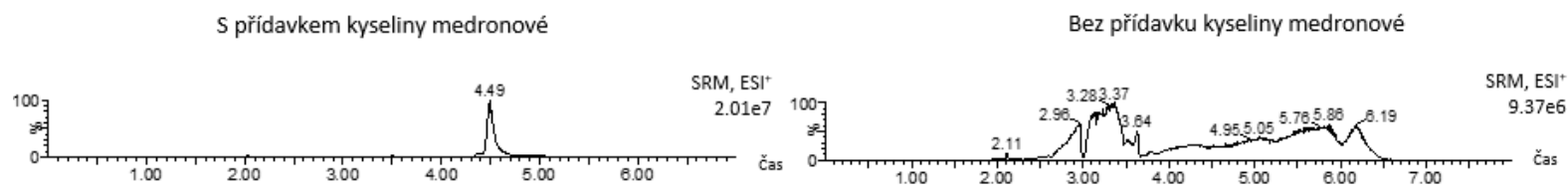
V dalším kroku bylo optimalizováno nastavení gradientové eluce. Srovnání výsledků je na obrázku 34. Testovány byly gradientové eluce končící v 5 minutě s 3minutovým izokratickým krokem na konci analýzy. Testováno bylo složení MF na konci gradientové eluce – 40 % ACN, 50 % ACN a 60 % ACN. Nejlépe se v tomto případě jevila gradientová eluce od 98 % ACN do 50 % ACN. Analyty, u kterých došlo ke změně selektivity, jsou v obrázku 34 označeny barevně. Jako kompromis pro separaci doravirinu s atazanavirem, tenofoviru alafenamidu s velpatasvirem a didanosinem byla zachována gradientová eluce končící 50 % ACN.

Stejně jako v případě RP byl do obou složek mobilní fáze nutný přídavek kyseliny medronové pro eluci tenofoviru. Bez přídavku kyseliny medronové byl pík tenofoviru rozmytý do takové míry, že byl na chromatogramu jen velmi obtížně identifikovatelný. Srovnání píků před a po přídavku kyseliny medronové je na obrázku 35.

Obrázek 34: Srovnání chromatogramů gradientové eluce během 5 minut s různým složením mobilní fáze na jejím konci.



Obrázek 35: Vliv přidavku kyseliny medronové na tvar píku tenofoviru v HILIC.



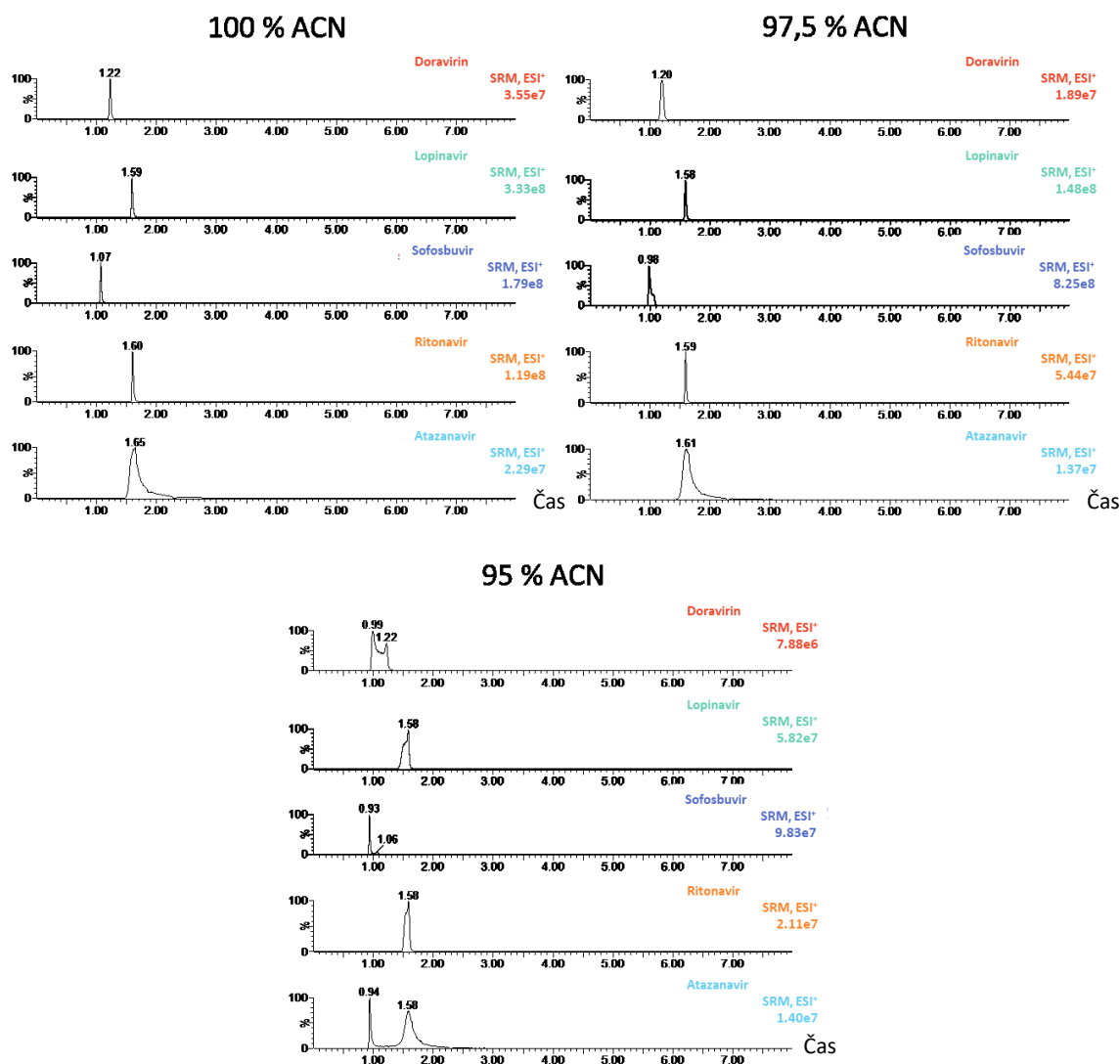
5.2.4. Vliv rozpouštědla v HILIC

Testovány byly acetonitril ve vodě a acetonitril v methanolu v daných poměrech (viz 4.5.4). V rámci jednotlivých rozpouštědel byl posuzován vliv na tvary píků, odezvu a vliv na separaci.

V případě acetonitrilu se ukázalo jako nejlepší rozpouštědlo 97,5 – 100 % ACN. Při použití již 95 % ACN dochází k výraznému štěpení píků a poklesu signálu u atazanaviru, bocepreviru, rilpivirinu, saquinaviru a tenofoviru monoesteru. Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl s ohledem na tvar píků a separaci zachován 100 % ACN. Tvary píků negativně ovlivněných analytů jsou na obrázku 36.

V případě vlivu kombinací ACN a MeOH na odezvu se jako nejlepší ukázala směs s nejvyšším zastoupením ACN – 90 % ACN, 10 % MeOH. S přihlédnutím k chromatografii se ovšem stále jevil jako vhodnější volba ACN.

Obrázek 36: Vliv rozpouštědla na tvary píků vybraných analytů v HILIC.



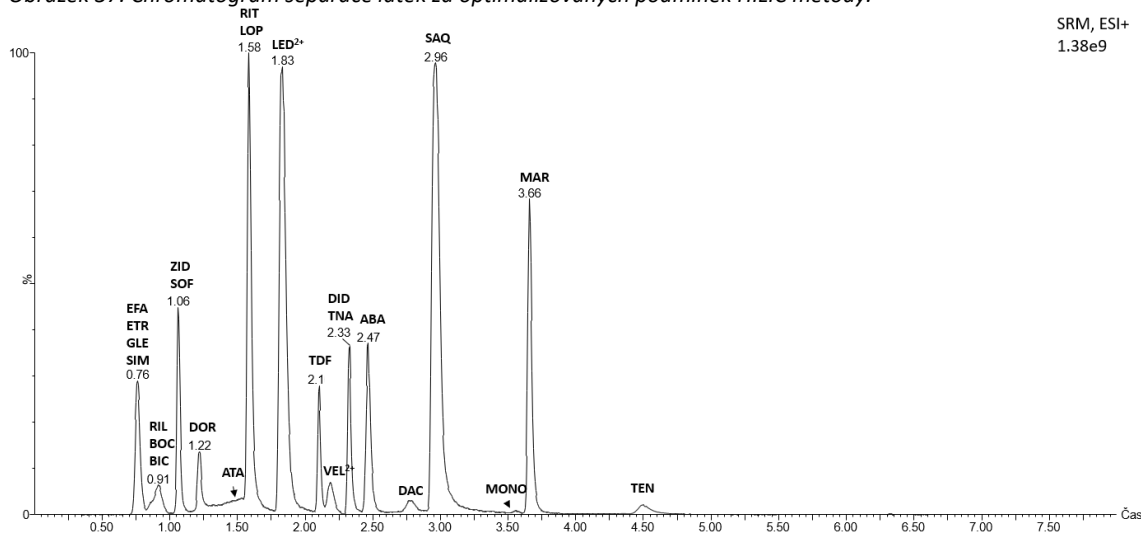
5.2.5. Souhrn optimalizovaných podmínek pro metodu v módu HILIC

V tabulce 25 jsou shrnuty optimalizované parametry metody HILIC. Na obrázku 37, je separace při optimalizovaných podmínkách. Jednotlivé SRM přechody jsou uvedeny přehledně na obrázku 38.

Tabulka 25: Souhrn optimalizovaných podmínek pro HILIC metodu.

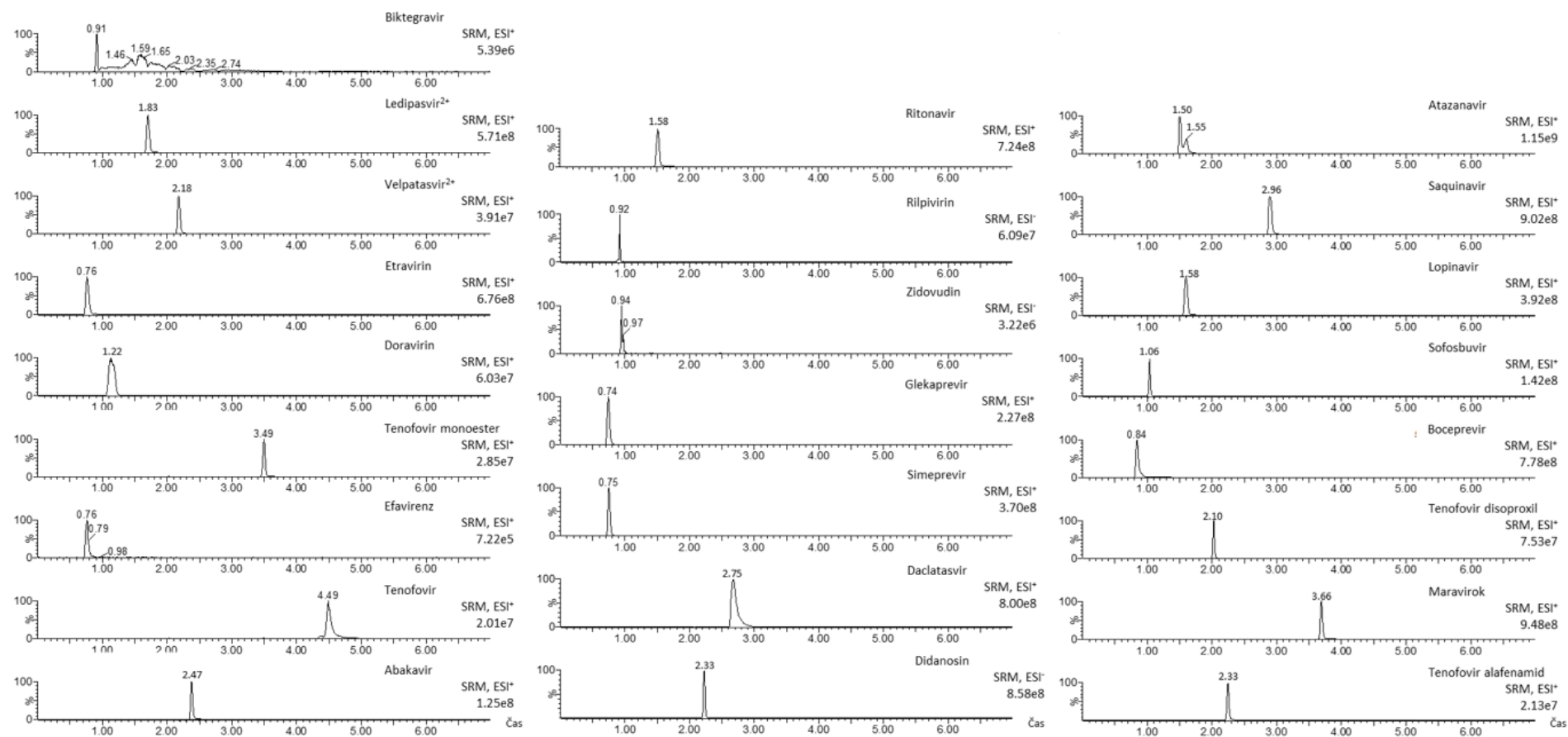
Parametr	Nastavení parametru	
Kolona	Ascentis Express HILIC (2,1 x 100 mm, 2,7 µm)	
Mobilní fáze	25 mM mravenčan amonný pH 3 + 0,1 % kyselina medronová	ACN + 0,1 % kyselina medronová
Průtoková rychlost	0,3 mL/min	
Gradientová eluce	98 % ACN – 50 % ACN, během 5 minut	
Nastříkaný objem	2 µL	
Teplota kolony	40°C	
Teplota dávkovače vzorku	10°C	
Silná oplachová kapalina	40 % ACN	
Slabá oplachová kapalina	90 % ACN	
Rozpouštědlo vzorku	ACN	

Obrázek 37: Chromatogram separace látek za optimalizovaných podmínek HILIC metody.



BIC poskytuje velice rozmytý pík. K tomuto fenoménu ovšem docházelo při použití všech mobilních fází a na všech použitých kolonách v HILIC. Tvar ATA byl problematický napříč jednotlivými SF i MF v módu HILIC, štěpení v tomto případě bylo způsobeno přidavkem kyseliny medronové do mobilní fáze, vzhledem k tomu, že při testování vlivu rozpouštědla na tvary píků byl pík pouze rozmytý, nikoli rozštěpený. Přídavek kyseliny medronové je ovšem třeba pro eluci TEN, je tedy nutný tento kompromis.

Obrázek 38: Jednotlivé SRM přechody získané při podmínkách optimalizované HILIC metody.



5.3. Vývoj μ -SPE-PT metody

5.3.1. Výběr sorbentu a optimalizace jeho množství

Testováno bylo celkem 6 sorbentů ve třech vrstvách: oktyl (C8), oktadecyl (C18), styrendivynylbenzen (SDB), porézní grafitový uhlík (PGC) a dva iontoměníče – kationtový (CX) a aniontový (AX). Testy byly prováděny s roztoky standardů. Většina analytů byla dobře zachycena na sorbentu C8 a C18. Kritické byly následující analyty: biktegravir, boceprevir, maravirok a tenofovir, které byly zachyceny na AX. U tenofoviru se vyskytl problém s elucí, kdy se ze sorbentu – AX eluoval pouze ve 2 % - 3 %. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 26, červeně jsou označené analyty, které neeluovaly nebo nebyly zadrženy, modře pak analyty s výtěžností pod 20 %.

Tabulka 26: Výtěžnost extrakcí pro jednotlivé sorbenty.

Analyt	C8	C18	SDB	PGC	CX	AX
Abakavir	123,5	115,4	0,0	2,3	0,0	37,4
Atazanavir	111,7	111,5	2,0	0,8	0,0	90,7
Biktegravir	1,5	0,9	64,8	0,0	31,3	82,5
Boceprevir	95,0	96,5	35,2	67,7	48,0	93,1
Daclatasvir	156,9	164,5	0,0	0,0	0,0	150,7
Didanosin	85,0	117,9	68,5	0,0	0,0	17,8
Doravirin	108,8	111,4	105,5	4,7	99,9	99,7
Efavirenz	125,5	129,4	119,9	10,3	125,6	103,1
Etravirin	137,0	143,0	129,0	0,5	0,1	110,8
Glekaprevir	115,4	121,8	113,5	0,0	110,5	1,7
Ledipasvir	125,4	118,0	1,3	0,0	0,0	108,4
Ledipasvir ²⁺	123,1	116,1	1,7	0,0	0,1	108,3
Lopinavir	96,4	89,1	23,7	0,0	1,0	96,9
Maravirok	0,0	0,0	1,2	38,8	0,3	176,3
Rilpivirin	125,0	131,6	0,5	0,0	0,0	107,3
Ritonavir	121,3	118,4	16,5	0,0	0,0	101,4
Saquinavir	55,2	51,4	0,2	0,7	0,0	109,8
Simeprevir	112,7	113,3	106,6	0,1	0,0	0,0
Sofosbuvir	106,3	108,5	53,1	4,1	76,8	91,6
Tenofovir	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3
Tenofovir alafenamid	101,5	89,1	0,0	0,7	0,0	103,3
Tenofovir disoproxil	105,3	105,3	0,2	12,7	0,0	98,0
Tenofovir monoester	48,4	40,6	5,3	0,0	0,0	0,0
Velpatasvir	126,7	122,5	0,8	0,0	0,0	109,9
Velpatasvir ²⁺	125,6	120,2	0,9	0,0	0,1	105,4
Zidovudin	105,9	106,4	101,4	2,3	98,2	10,5

Dále byl optimalizován počet vrstev plněných do pipetových špiček pro 2 vybrané sorbenty: C18 a AX. Testovaný počet vrstev byl 1 – 6. Jako dostatečný počet vrstev se ukázal v obou případech 1 – 3. Detailní výsledky jsou v prezentovány tabulce 27, červeně jsou označené analyty, které neeluovaly, modře pak analyty s výtěžností do 20 %.

Dále byly testovány kombinace počtu vrstev dvou vybraných sorbentů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 28, modře jsou označené analyty s výtěžností pod 20 %. Absence MAR a SIM a nízká výtěžnost MONO, BIC, GLE a TEN je způsobena neoptimálním elučním činidlem. DID, stejně jako ZID byl lépe zadržován na kombinacích s více vrstvami AX (srovnání 2 C18 + 1 AX s 1 C18 + 2 AX a 3 C18 + 2 AX s 2 C18 + 3 AX). Vybrána byla kombinace 2 vrstev C18 a 2 vrstev AX, která v dostatečné míře zadržela všechny analyty.

Tabulka 27: Optimalizace počtu vrstev sorbentů C18 a AX v individuálním provedení pro každý sorbent.

Analyt	Počet vrstev C18						Počet vrstev AX					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Abakavir	21,5	102,3	98,8	90,4	101,7	90,6	10,1	21,7	34,5	45,5	55,8	56,4
Atazanavir	91,2	94,0	92,8	86,4	88,4	90,7	80,4	102,7	102,6	104,0	106,8	109,6
Biktegravir	21,2	4,6	0,6	0,1	0,1	0,1	80,3	88,9	90,0	92,7	92,8	88,4
Boceprevir	91,0	95,6	93,5	88,9	92,7	92,5	90,0	108,6	108,1	105,6	105,6	105,6
Daclatasvir	160,5	124,8	122,3	120,2	109,7	118,1	109,0	141,4	117,2	156,1	157,0	138,8
Didanosin	0,0	39,7	57,9	104,7	121,4	121,7	10,1	15,2	19,6	21,1	24,7	23,1
Doravirin	67,5	105,1	107,4	99,7	109,7	108,4	96,6	106,8	108,0	103,3	104,3	106,6
Efavirenz	98,1	105,0	102,6	96,4	101,9	108,4	89,5	101,4	101,8	109,8	106,2	105,2
Etravirin	90,2	86,1	88,3	89,4	91,8	97,0	91,3	97,6	99,9	104,9	104,2	107,0
Glekaprevir	98,7	101,3	99,3	93,5	96,5	118,8	1,2	1,3	1,5	1,2	1,1	1,0
Ledipasvir	88,5	82,4	78,4	75,0	73,5	76,0	86,6	93,8	95,8	101,5	101,4	101,0
Ledipasvir ²⁺	89,9	88,8	86,7	84,6	84,3	87,8	98,1	104,0	101,3	100,8	99,2	98,9
Lopinavir	87,1	87,0	71,3	58,6	46,5	42,4	91,5	111,4	105,1	109,7	106,2	106,3
Maravirok	26,5	2,8	0,2	0,0	0,0	0,0	25,4	76,7	100,6	180,4	193,8	180,4
Rilpivirin	104,1	118,4	90,4	100,2	93,6	99,2	97,5	132,7	112,1	105,9	102,4	100,8
Ritonavir	94,1	90,8	84,5	74,3	75,9	64,9	105,3	107,6	107,1	114,0	114,5	111,5
Saquinavir	75,6	65,4	43,1	15,7	6,8	2,5	87,8	104,2	102,8	104,3	105,6	105,2
Simeprevir	93,2	91,0	89,2	91,8	90,7	93,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sofosbuvir	101,0	106,2	109,0	101,1	109,7	112,0	91,6	104,3	106,7	99,7	100,6	100,6
Tenofovir	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	2,8	2,4	2,5	2,3	2,4
Tenofovir alafenamid	70,7	79,7	67,5	57,5	60,5	49,6	95,2	111,1	112,3	113,3	113,0	114,3
Tenofovir disoproxil	93,5	100,5	99,7	91,0	103,6	101,1	90,8	104,3	107,2	107,7	107,8	109,0
Tenofovir monoester	0,1	23,6	36,1	26,3	19,5	18,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Velpatasvir	75,9	80,2	79,4	76,7	76,3	79,4	85,8	93,9	95,5	101,3	102,9	101,6
Velpatasvir ²⁺	79,9	84,2	83,1	81,5	80,8	84,0	91,3	99,0	96,5	98,4	97,5	96,4
Zidovudin	1,5	70,6	96,3	106,2	111,2	110,7	4,5	3,3	5,6	17,0	20,7	21,5

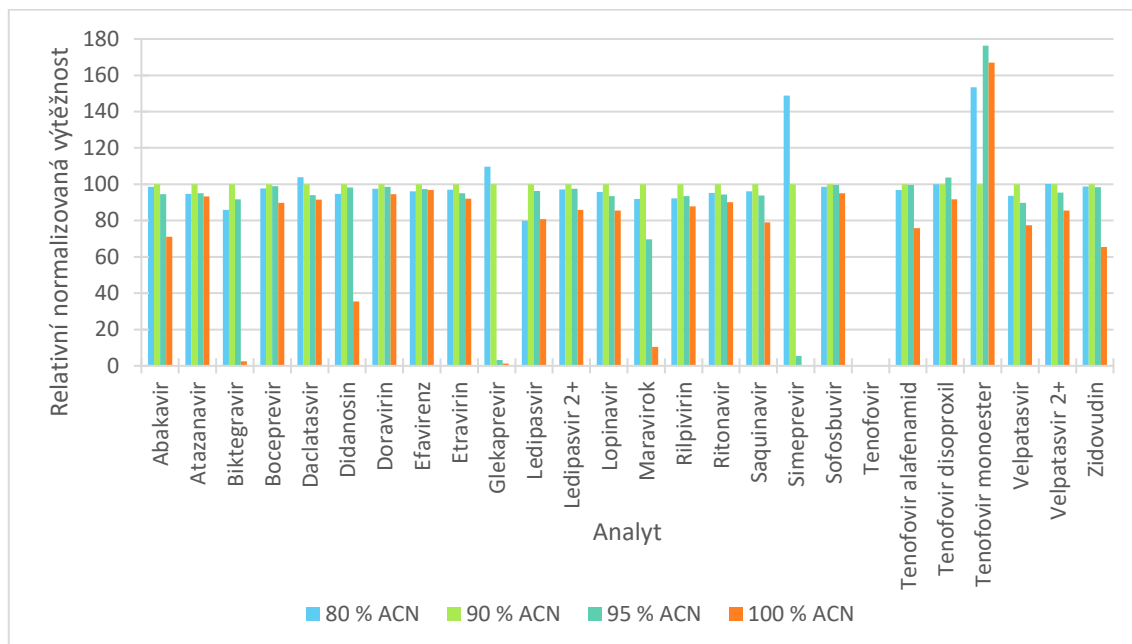
Tabulka 28: Výsledky optimalizace kombinací vrstev sorbentů C18 a AX.

Analyt	1x C18, 1x AX	1x C18, 2x AX	2x C18, 1x AX	2x C18, 2x AX	2x C18, 3x AX	3x C18, 2x AX	3x C18, 3x AX
Abakavir	101,8	104,5	95,8	100,7	103,0	106,8	98,3
Atazanavir	93,9	96,8	96,8	94,9	89,1	99,0	91,2
Biktegravir	5,8	0,7	7,1	0,8	0,1	0,2	0,3
Boceprevir	90,9	93,9	98,3	95,7	92,4	98,0	92,2
Daclatasvir	109,3	99,6	100,8	89,3	84,1	87,3	73,0
Didanosin	24,7	66,2	29,3	48,8	82,4	44,6	49,4
Doravirin	103,3	109,8	108,4	107,9	114,6	110,9	107,1
Efavirenz	94,1	100,5	98,3	96,9	100,4	99,2	98,7
Etravirin	84,6	91,8	91,9	95,1	93,0	93,5	91,4
Glekaprevir	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3
Ledipasvir	99,8	96,6	89,4	85,7	82,2	80,8	77,9
Ledipasvir ²⁺	99,4	94,5	93,5	91,9	85,3	87,7	85,6
Lopinavir	82,0	72,3	87,2	70,0	48,7	68,5	53,0
Rilpivirin	165,1	104,9	109,5	106,8	110,9	107,9	120,9
Ritonavir	90,2	87,5	95,8	101,3	72,3	85,1	73,1
Saquinavir	69,5	41,5	69,4	36,7	11,4	27,3	21,4
Sofosbuvir	97,5	103,6	103,7	101,6	106,0	103,0	98,6
Tenofovir	3,5	3,2	3,2	3,3	3,3	3,0	3,0
Tenofovir alafenamid	79,1	82,1	91,9	74,5	69,3	80,8	62,9
Tenofovir disoproxil	93,9	105,0	105,6	101,1	106,9	108,4	96,1
Tenofovir monoester	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Velpatasvir	84,0	84,4	83,4	78,8	71,0	73,7	71,2
Velpatasvir ²⁺	83,3	81,0	82,9	80,4	70,4	74,9	73,0
Zidovudin	56,9	100,5	76,8	100,8	107,8	104,8	103,4

5.3.2. Optimalizace složení elučního činidla

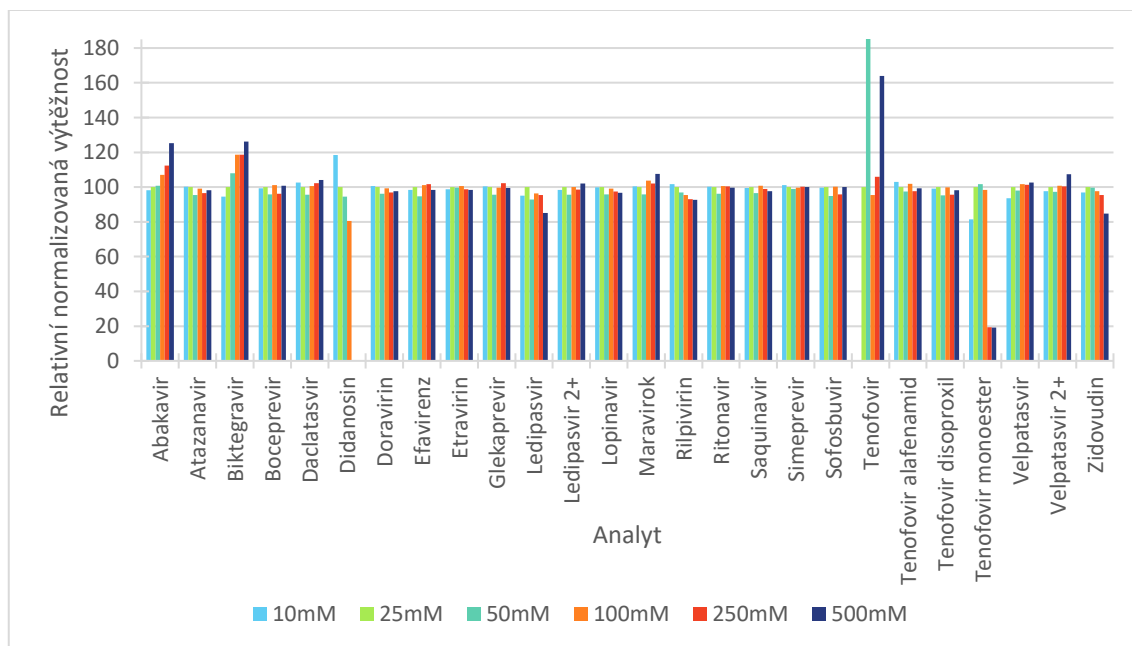
Byl optimalizován podíl ACN v elučním činidle – viz obrázek 39. S ohledem na glekaprevir, maravirok a simeprevir byl jako nejvhodnější eluční činidlo zvolen 90 % ACN ve vodě. Tenofovir nebyl díky příliš silné vazbě na AX eluován.

Obrázek 39: Optimalizace podílu ACN v elučním činidle.



Dále byl testován přídavek kyseliny mravenčí do elučního činidla, především pro zvýšení podílu eluovaného tenofoviru – viz obrázek 40. Jako nejvhodnější varianta byl zvolen přídavek 25 mM kyseliny mravenčí, který zajistil eluci tenofoviru a v porovnání s 50 mM přídavkem výrazně nezhoršil tvary píků DAC, MAR, MONO, RIL, TDF, TNA, VEL.

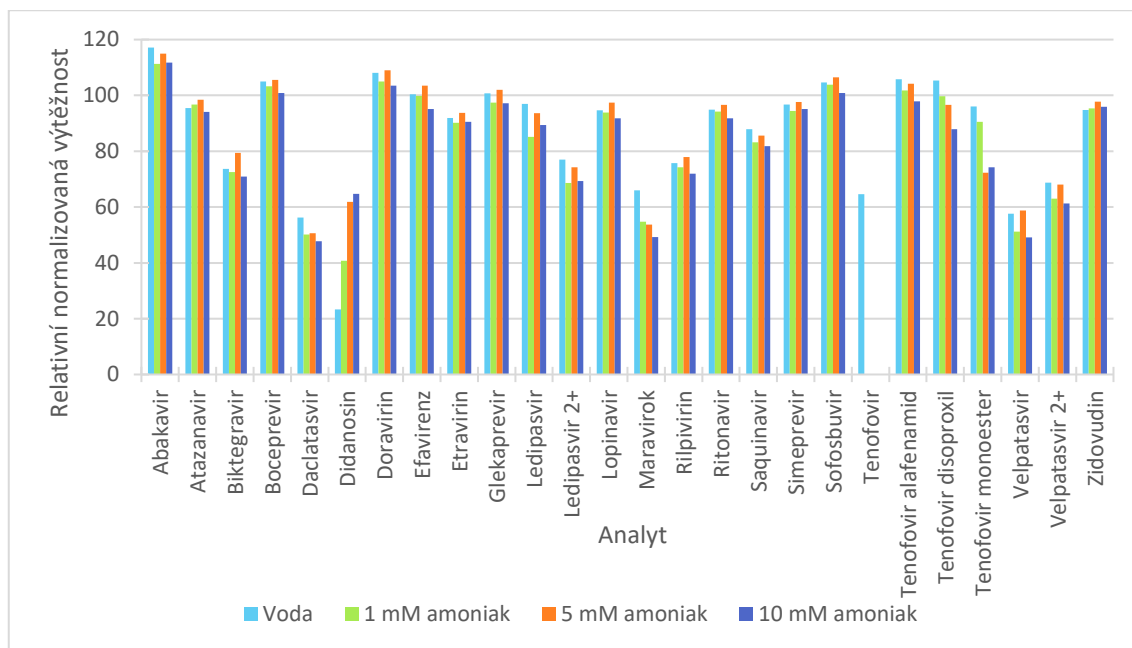
Obrázek 40: Optimalizace přídavku kyseliny mravenčí do elučního činidla – 90 % ACN ve vodě.



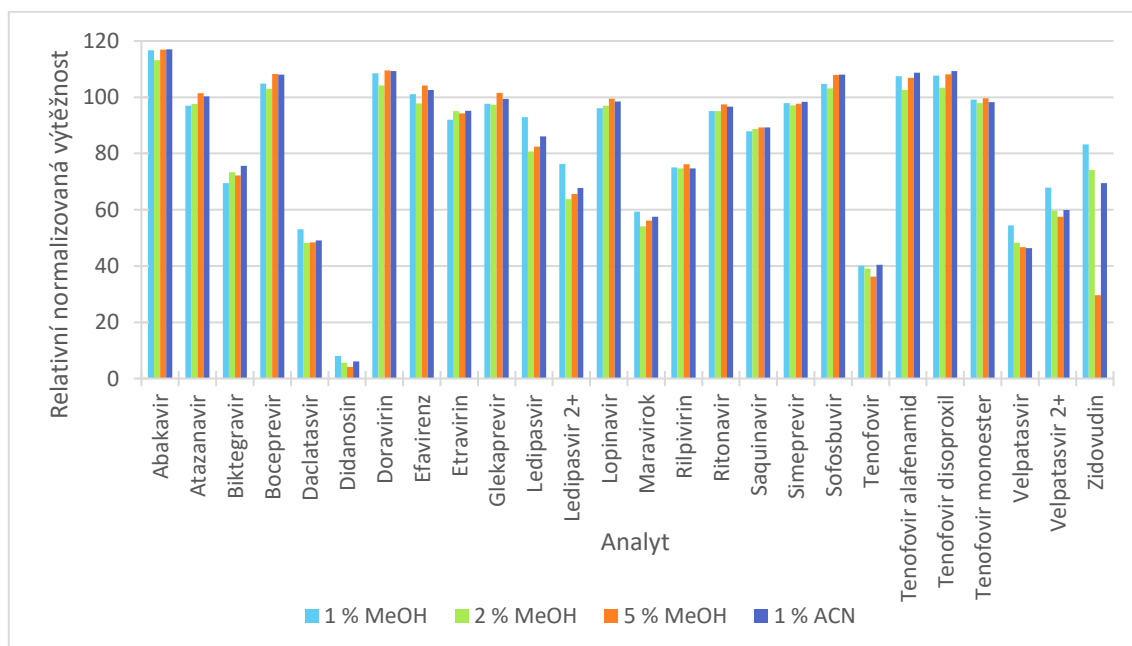
5.3.3. Optimalizace složení promývacího činidla

Testovány byly přídavky amoniaku do vody a dále pak přídavky ACN a MeOH do vody – obrázky 41 a 42. Kritické analyty při výběru promývacího činidla byly didanosin, tenofovir a zidovudin. S ohledem na problematické chování tenofoviru během eluce, kritický vliv přídavku amoniaku do promývacího činidla pro didanosin a vliv přídavku ACN, či MeOH na ztráty zidovudinu byly upřednostněny podmínky vhodné pro didanosin a zidovudin. Jako promývací činidlo byl vybrán 5 mM amoniak ve vodě. Jako alternativní promývací činidlo by bylo možné na úkor DID použít i vodu.

Obrázek 41: Optimalizace promývacího činidla – přídavek amoniaku.



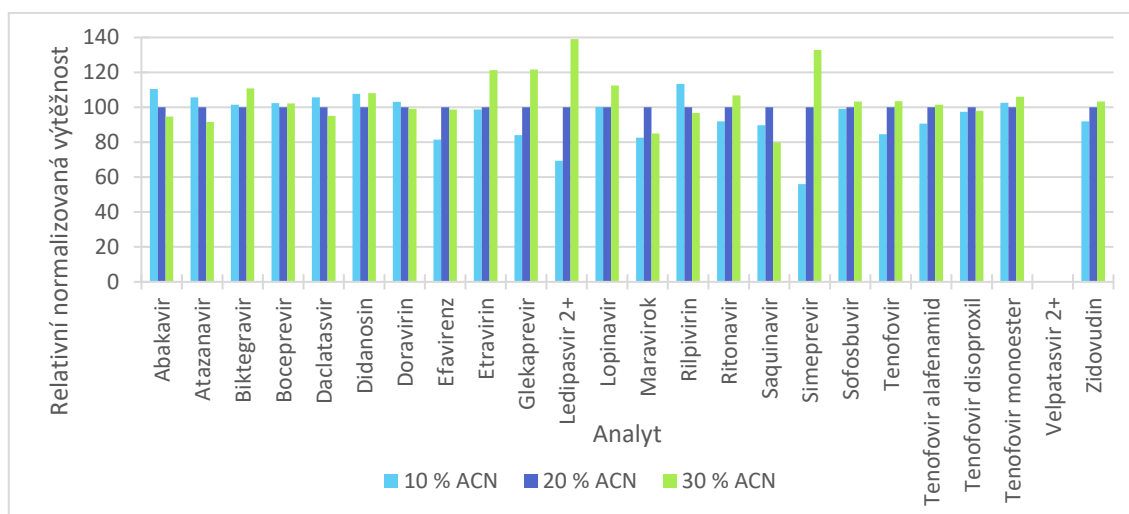
Obrázek 42: Optimalizace promývacího činidla – přídavek malého % ACN a MeOH.



5.3.4. Odpaření a rekonstituce vzorku

Za účelem eliminace ředění extraktu (90 % ACN extrakt byl ředěn do 20 % ACN pro analýzu v módu RP), a tím snížení LLOQ, byl testován krok odpaření elučního činidla a rekonstituce vzorku vhodným rozpouštědlem. Testován byl 10 % - 30 % ACN (dle postupu v kapitole 4.6.4 – rozpuštění v ACN (důležité pro analyty s vyšším logP) a ředění vodou do příslušného % zastoupení ACN). Výsledky jsou v obrázku 43 normalizované na vybrané rozpouštědlo – 20 % ACN, který je vhodný i z hlediska chromatografie, protože se jedná o optimalizované rozpouštědlo vzorku. Velpatasvir byl v měřeném vzorku v nedostatečné koncentraci.

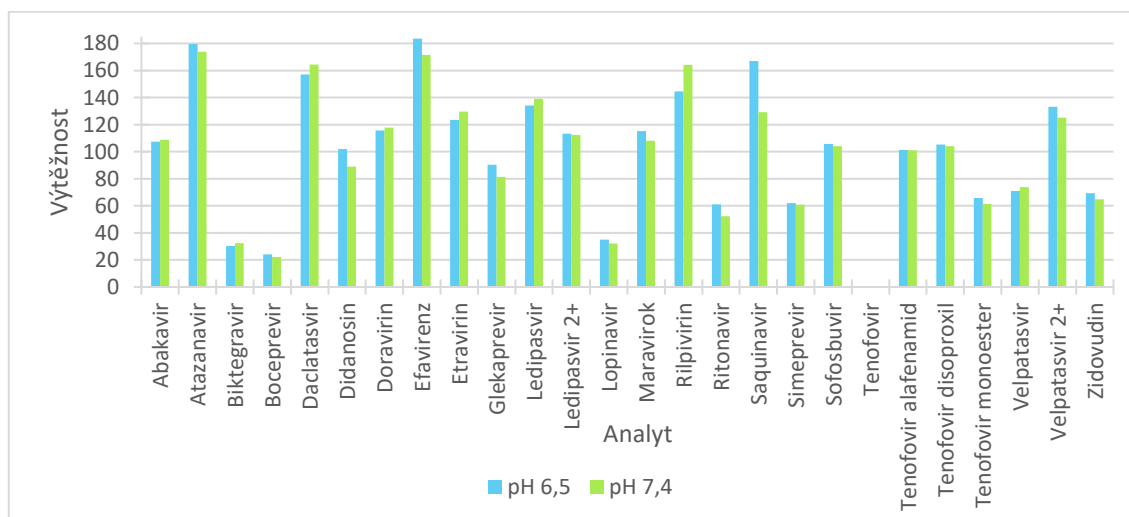
Obrázek 43: Optimalizace rozpouštědla pro rekonstituci vzorku.



5.3.5. Extrakce z HBS média

Bylo provedeno ověření funkčnosti extrakční metody pro HBS médium – viz obrázek 44. Pro tenofovir bohužel metoda nedosáhla kvantifikovatelné výtěžnosti z důvodu nedostatečné a nerobustní eluce. U biktegraviru, bocepreviru a lopinaviru došlo k poklesu výtěžnosti ke 30 % – 40 %. U atazanaviru, daclatasviru, efavirenzu a saquinaviru došlo naopak k výraznému zvýšení výtěžnosti. Na extrémních hodnotách zvýšení či snížení výtěžnosti mohou mít vliv matricové efekty – i přesto je však metoda pro 23 ze 24 analytů funkční.

Obrázek 44: Extrakce z HBS média.



5.3.6. Souhrn optimalizovaných podmínek pro μ -SPE-PT

Složení sorbentu:	1. vrstva 2x AX, 2. vrstva 2x C18
Aktivace:	100 μ L ACN, centrifugace 6 °C, 8 000 RPM, 7 minut
Kondicionace	100 μ L vody, centrifugace 6 °C, 8 000 RPM, 30 minut
Nanesení vzorku:	100 μ L, centrifugace 6 °C, 8 000 RPM, 30 minut
Promytí:	100 μ L 5 mM amoniaku ve vodě, centrifugace 6 °C, 8 000 RPM, 30 minut
Eluce:	100 μ L 25 mM FA v 90 % ACN, centrifugace 6 °C, 8 000 RPM, 10 minut
Úprava extraktu:	Odpaření na vakuové odparce 15 minut
Rekonstituce:	1. krok 20 μ L ACN, 10 minut třepání 2. krok 80 μ L vody, 15 minut ultrazvukování

Doba centrifugace byla upravena z původních 5 000 RPM na 8 000 RPM kvůli času nutnému pro centrifugaci vodných vzorků nanesených na sorbent AX.

5.4. Validace metody na reverzních fázích

Byla měřena matricová kalibrace s použitím vnitřních standardů pro jednotlivá HBS média. V tabulce 29 jsou shrnuty limity kvantifikace a korelační koeficienty pro daná HBS média. Pro TEN nebylo kvůli problému eluce a z důvodu nedostatečné robustnosti extrakční metody pro tento analyt možné provést kvantifikaci v médiu o pH 7,4.

Tabulka 29: Matricové kalibrace pro jednotlivá média v módu RP.

Analyt	HBS médium pH 6,5			HBS médium pH 7,4		
	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient
Abakavir	0,005	2	0,99820	0,02	2	0,99866
Atazanavir	0,2	200	0,99895	0,1	200	0,99959
Biktegravir	0,02	2	0,99783	0,1	2	0,98266
Boceprevir	2	200	0,99815	10	200	0,99519
Daclatasvir	10	20 000	0,99752	20	5 000	0,98076
Didanosin	100	20 000	0,99847	10	20 000	0,99534
Doravirin	0,1	20	0,99650	0,05	20	0,99724
Efavirenz	1	100	0,99775	1	100	0,99526
Etravirin	5	500	0,99742	5	1 000	0,99528
Glekaprevir	2	200	0,99491	2	200	0,99667
Ledipasvir ²⁺	2	200	0,99752	5	200	0,95824
Lopinavir	0,5	20	0,99496	1	20	0,98644
Maravirok	0,02	20	0,99640	0,2	20	0,99019
Rilpivirin	1	100	0,99731	0,5	200	0,99377
Ritonavir	0,5	20	0,99670	0,5	20	0,98908
Saquinavir	0,1	200	0,99922	2	200	0,99734
Simeprevir	0,2	20	0,99752	1	20	0,95884
Sofosbuvir	0,05	20	0,99852	0,2	20	0,99893
Tenofovir	0,5	20	0,99615	n/a		
Tenofovir alafenamid	0,01	2	0,99821	0,02	2	0,99613
Tenofovir disoproxil	0,02	2	0,99620	0,02	2	0,99372
Tenofovir monoester	0,02	2	0,99872	0,02	2	0,99704
Velpatasvir ²⁺	5	200	0,99370	10	200	0,96550
Zidovudin	1	200	0,99585	5	200	0,98738

Byla hodnocena správnost a přesnost měření na čtyřech koncentračních hladinách – hladina LLOQ (velmi nízká hladina), hladina kolem 3x LLOQ (nízká hladina), hladina mezi 30 – 50 % rozsahu kalibrace (střední hladina) a hladina blízko ULOQ (vysoká hladina), dle Guideline on bioanalytical method validation od European Medicines Agency. Všechny parametry byly vyhodnoceny s použitím matricové kalibrační křivky. V případě HBS média pH 6,5 nebylo díky

chybě vzniklé v pipetování možné stanovit na hladině blízko ULOQ (vysoká hladina) správnost ani přesnost pro BIC, BOC, DAC, GLE, SIM, TDF a MONO (označeno červeně v tabulce 30). V případě LED, LOP, RIT, TEN a VEL byly hodnoty střední a vysoké hladiny mimo validované kalibrační rozmezí (označeno červeně v tabulce 30). Pro vyřešení tohoto problému by tedy bylo nutné zvolit jiné – vyšší, či nižší validační hladiny pro přesnost a správnost, případně rozšířit rozsah matricové kalibrační křivky, či zavést individuální interní standardy. V případě DID nebylo dosaženo na žádné hladině adekvátní správnosti (80 % – 120 % v případě velmi nízké hladiny a 85 % – 115 % u ostatních hladin), u TEN byla správnost pod limitem pouze u nízké hladiny (označeno modře v tabulce 30). Řešením pro DID by z důvodu silných matricových efektů mohl být jeho vlastní vnitřní standard. V případě TEN by to byla úprava extrakční metody – vyšší podíl kyseliny mravenčí v elučním činidle, změna kyseliny v elučním činidle za silnější (trifluoroctová kyselina) – pro zajištění neionizované formy TEN a bezproblémové eluce z AX.

V případě HBS média pH 7,4 nebylo dosaženo limitní přesnosti či správnosti 6 analytů – BIC, DID, LED, SAQ, SIM a VEL (v tabulce 31 modře). Tyto problémy by opět bylo možno vyřešit zavedením vnitřních standardů pro zmíněné analyty. Střední a/nebo vysoká koncentrační hladina mimo validované koncentrační rozmezí znemožnila určení správnosti a přesnosti u BIC, BOC, LED, LOP, RIT, SAQ, VEL a ZID (v tabulce 31 červeně). Řešením by byla volba vyšších validačních hladin pro přesnost a správnost. U TEN nebyla hodnocena ani správnost, ani přesnost kvůli absenci matricové kalibrační křivky.

Byly stanoveny matricové efekty pro 2 hladiny kalibrace – viz tabulka 30 a 31. Hodnoty jsou upraveny na jednotlivé vnitřní standardy. Velmi silné matricové efekty vykazuje DID na hladině A, rovněž pro ETR, GLE a SIM byl zaznamenán silný pokles signálu. Naproti tomu u dvojnásobně nabitého LED a VEL signál velice markantně narostl. Řešením této situace by bylo zavedení značených vnitřních standardů pro zasažené analyty, a tím zlepšení přesnosti a správnosti jejich stanovení.

Plná validace metody na reverzních fázích byla úspěšná pro 11 analytů v případě HBS média o pH 6,5 a pro 13 analytů v případě HBS média pH 7,4.

Tabulka 30: Výsledky validačních parametrů v HBS médiu pH 6,5 s využitím metody RP-UHPLC-MS/MS.

Analyt	HBS médium pH 6,5 v RP									
	Velmi nízká hladina		Nízká hladina		Střední hladina		Vysoká hladina		Matricové efekty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Hladina C	Hladina A
Abakavir	99,0	4,7	97,0	2,0	93,2	2,0	98,2	1,8	100,4	103,4
Atazanavir	90,22	8,18	96,8	2,5	99,0	1,3	101,4	5,1	100,0	100,3
Biktegravir	118,8	2,51	98,8	6,1	98,4	9,8	n/a	n/a	138,0	98,4
Boceprevir	107,9	4,1	99,3	3,5	85,8	6,5	n/a	n/a	114,4	96,7
Daclatasvir	109,3	5,6	100,8	4,5	107,7	2,8	109,5	1,8	95,3	99,8
Didanosin	54,6	10,2	37,4	9,3	34,6	15,2	n/a	n/a	n/a	0,6
Doravirin	100,1	5,5	97,3	5,2	98,3	3,8	103,9	3,7	103,7	97,0
Efavirenz	102,9	2,7	106,0	5,2	103,1	3,7	101,7	6,4	91,4	94,9
Etravirin	106,0	3,6	95,6	4,1	96,8	2,9	102,4	3,1	105,3	29,0
Glekaprevir	101,5	5,6	106,6	2,3	106,3	5,3	n/a	n/a	70,9	35,0
Ledipasvir ²⁺	103,4	4,2	102,9	7,1	n/a	n/a	n/a	n/a	96,5	245,8
Lopinavir	103,8	5,0	87,8	13,6	n/a	n/a	n/a	n/a	121,2	74,0
Maravirok	109,3	3,2	96,2	5,8	89,3	4,5	108,4	3,2	105,4	78,9
Rilpivirin	105,0	4,7	95,6	5,6	93,0	8,0	101,8	3,3	n/a	n/a
Ritonavir	103,3	4,9	92,4	10,0	n/a	n/a	n/a	n/a	110,1	82,2
Saquinavir	104,3	2,0	104,7	5,1	102,6	7,1	97,1	4,8	72,0	102,1
Simeprevir	106,3	8,1	96,5	2,2	97,9	9,4	n/a	n/a	49,4	158,2
Sofosbuvir	106,2	4,3	94,1	2,9	9,9	2,8	96,5	1,9	101,3	99,1
Tenofovir	110,0	2,0	83,8	12,1	n/a	n/a	n/a	n/a	103,6	88,4
Tenofovir alafenamid	99,7	6,0	95,0	3,8	98,5	3,2	103,9	2,0	99,1	97,2
Tenofovir disoproxil	88,0	7,5	98,0	4,6	106,2	5,5	n/a	n/a	73,3	99,5
Tenofovir monoester	94,8	10,6	93,9	3,8	96,0	2,3	n/a	n/a	68,8	61,3
Velpatasvir ²⁺	111,0	10,0	101,3	4,68	n/a	n/a	n/a	n/a	77,9	215,0
Zidovudin	96,3	3,5	98,4	4,5	108,4	2,8	110,8	1,8	83,5	82,0

Tabulka 31: Výsledky validačních parametrů v HBS médiu pH 7,4 s využitím metody RP-UHPLC-MS/MS.

Analyt	HBS médium pH 7,4 v RP									
	Velmi nízká hladina		Nízká hladina		Střední hladina		Vysoká hladina		Matricové efekty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Hladina C	Hladina A
Abakavir	109,0	3,3	105,7	1,2	100,9	3,4	102,7	2,3	100,3	102,7
Atazanavir	98,8	1,0	102,2	1,0	100,7	1,1	101,8	1,1	98,5	100,6
Biktegravir	94,6	22,4	99,0	4,3	n/a	n/a	n/a	n/a	147,5	106,7
Boceprevir	91,7	11,1	98,5	7,1	n/a	n/a	n/a	n/a	101,9	96,4
Daclatasvir	101,3	16,6	92,6	8,65	115,6	7,7	86,3	9,3	86,2	94,3
Didanosin	9,8	72,4	17,9	59,9	13,5	73,1	12,0	81,0	n/a	0,5
Doravirin	96,3	2,4	97,4	7,5	97,3	7,9	103,4	3,8	98,0	102,0
Efavirenz	92,3	7,7	89,3	12,0	99,1	7,8	85,7	13,2	85,4	111,2
Etravirin	95,7	3,0	98,6	8,1	99,7	3,7	97,0	7,3	97,0	58,8
Glekaprevir	89,1	14,6	96,6	5,3	98,0	8,2	97,8	9,1	58,2	35,4
Ledipasvir ²⁺	112,2	34,0	110,9	8,9	105,3	16,8	n/a	n/a	106,5	243,3
Lopinavir	87,6	7,4	91,7	8,8	n/a	n/a	n/a	n/a	111,4	71,2
Maravirok	119,1	15,0	98,8	5,4	104,4	1,7	111,6	3,2	107,4	74,9
Rilpivirin	90,3	7,9	98,4	6,7	106,2	5,1	94,3	4,8	n/a	n/a
Ritonavir	93,9	11,1	90,2	11,3	96,7	9,4	n/a	n/a	110,3	86,6
Saquinavir	130,6	31,0	100,8	8,1	103,9	5,7	97,6	6,4	80,6	90,9
Simeprevir	64,9	29,6	34,5	37,1	n/a	n/a	n/a	n/a	34,8	100,2
Sofosbuvir	105,1	4,2	98,7	0,9	97,5	2,9	102,9	1,5	102,2	99,0
Tenofovir	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	109,4	90,2
Tenofovir alafenamid	95,7	6,6	101,2	3,2	98,6	6,7	101,6	3,1	97,6	97,8
Tenofovir disoproxil	91,2	10,1	100,1	4,8	99,9	13,7	102,0	3,7	79,0	86,6
Tenofovir monoester	91,3	7,3	97,8	5,2	94,0	11,5	93,6	9,8	76,8	68,9
Velpatasvir ²⁺	77,19	20,8	88,2	15,0	n/a	n/a	n/a	n/a	85,4	212,0
Zidovudin	94,0	6,9	94,4	13,7	110,2	1,0	n/a	n/a	83,5	84,6

5.5. Validace HILIC metody

Byla měřena matricová kalibrace s použitím vnitřních standardů pro jednotlivá HBS média v HILIC – viz tabulka 32. Pro RIL a TEN se nepodařilo provést kvantifikaci v obou médiích pravděpodobně kvůli vlivu matricových efektů v případě RIL a kvůli problematické eluci během přípravy vzorku a nerobustnosti extrakční metody v případě TEN (viz závěry z 5.4.). Pro BIC a LED byla kvantifikace neúspěšná pouze v médiu o pH 7,4, pravděpodobně kvůli vlivu pH média na zachycení analytu – v RP bylo v médiu pH 7,4 dosaženo vyššího LLOQ v porovnání s médiem 6,5.

Tabulka 32: Souhrn výsledků pro matricové kalibrace pro jednotlivá média v módu HILIC.

Analyt	HBS médium pH 6,5			HBS médium pH 7,4		
	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient
Abakavir	0,002	2	0,99939	0,005	2	0,99979
Atazanavir	0,01	100	0,99934	0,01	100	0,99932
Biktegravir	0,1	2	0,99151	n/a		
Boceprevir	0,1	100	0,99871	0,5	200	0,99857
Daclatasvir	5	1000	0,99689	1	500	0,99878
Didanosin	100	5000	0,99779	10	500	0,99647
Doravirin	0,01	10	0,99839	0,02	20	0,99933
Efavirenz	5	200	0,99636	10	200	0,99203
Etravirin	0,2	2000	0,99890	0,2	1000	0,99843
Glekaprevir	0,05	100	0,99906	0,1	200	0,99900
Ledipasvir ²⁺	0,02	100	0,99917	0,2	100	0,99596
Lopinavir	0,02	10	0,99650	0,1	20	0,99770
Maravirok	0,1	20	0,99721	0,05	10	0,99273
Rilpivirin	n/a			n/a		
Ritonavir	0,002	10	0,99913	0,002	20	0,99922
Saquinavir	0,01	100	0,99952	0,1	100	0,99842
Simeprevir	0,2	10	0,99599	0,05	20	0,99947
Sofosbuvir	0,01	10	0,99815	0,02	20	0,99879
Tenofovir	n/a			n/a		
Tenofovir alafenamid	0,005	2	0,99933	0,002	2	0,99950
Tenofovir disoproxil	0,005	2	0,99820	0,002	2	0,99936
Tenofovir monoester	0,01	2	0,99708	0,005	1	0,99805
Velpatasvir ²⁺	0,5	100	0,99737	0,1	10	0,99721
Zidovudin	1	100	0,99529	n/a		

Pro TEN a RIL nebylo možné stanovit správnost ani přesnost kvůli absenci matricové kalibrační křivky. V případě DID, EFA a SIM byla nedostatkem validace absence vysoké hladiny v tabulce 33 označené červeně. Řešením by bylo přidání kalibračních hladin do kalibrační křivky, či volba jiných hladin pro validaci správnosti a přesnosti. Pro DAC, DID, EFA, ETR, GLE, LOP, MAR, RIT, SAQ, MONO a ZID nebylo dosaženo limitů přesnosti a správnosti – v tabulce 33 označené modře. Řešením by bylo zavedení vlastních značených vnitřních standardů pro tyto analyty.

V tabulce 33 jsou shrnuty výsledky měření matricových efektů v médiu o pH 6,5. Pro BIC a RIL nebylo stanovení matricových efektů úspěšné. Silné matricové efekty byly stanoveny v případě ZID, TEN a DID. Řešením pro tyto analyty by bylo zavedení značených vnitřních standardů pro eliminaci matricových efektů a zlepšení přesnosti a správnosti jejich stanovení. EFA se pro hladinu E nepodařilo úspěšně kvantifikovat (hladina E je pod LLOQ). Metoda nebyla z časových důvodů validována pro médium pH 7,4.

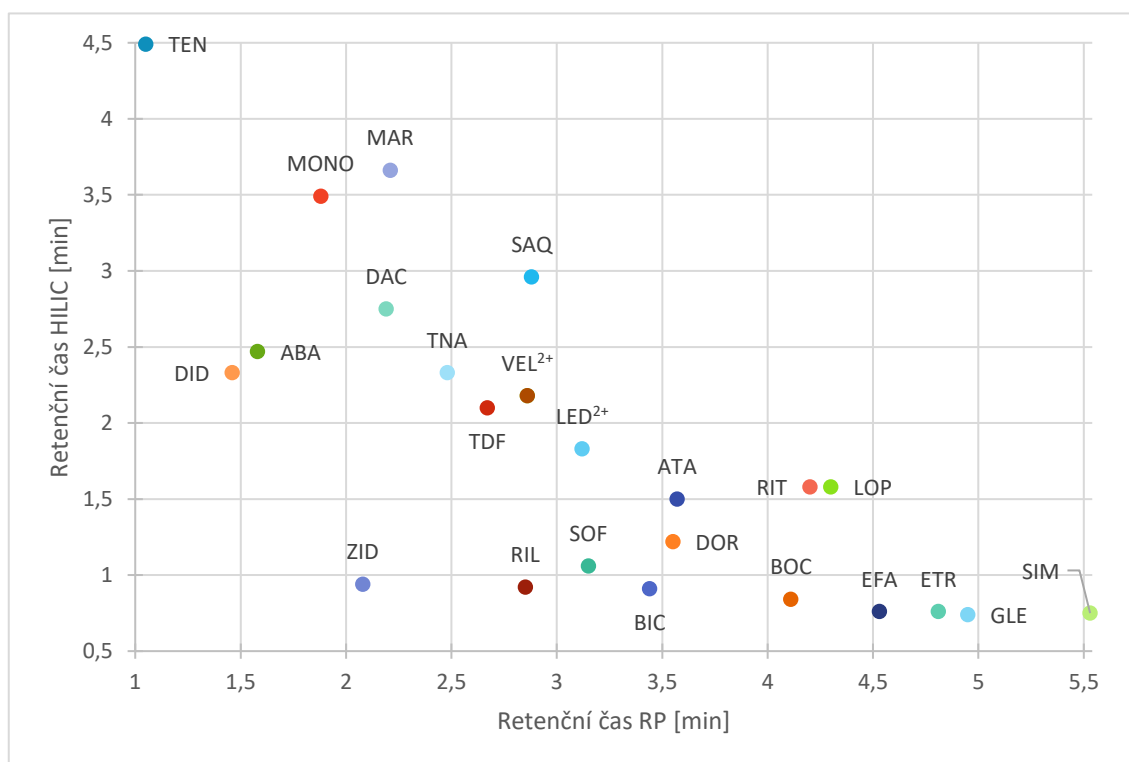
Tabulka 33: Výsledky validačních parametrů v HBS médiu pH 6,5 s využitím metody HILIC-UHPLC-MS/MS.

Analyt	HBS médium pH 6,5 v HILIC									
	Velmi nízká hladina		Nízká hladina		Střední hladina		Vysoká hladina		Matricové efekty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Hladina E	Hladina A
Abakavir	100,0	0,0	106,0	3,5	96,4	1,1	92,1	1,0	102,0	101,0
Atazanavir	101,6	1,0	100,0	0,7	107,9	1,2	108,5	1,1	91,8	103,4
Biktegravir	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Boceprevir	107,1	2,7	103,5	9,2	110,3	2,0	102,1	3,8	107,0	82,0
Daclatasvir	159,4	6,4	168,4	10,5	151,6	4,6	95,9	6,7	98,1	95,0
Didanosin	103,7	57,3	93,1	56,1	182,8	60,0	n/a	n/a	68,1	96,2
Doravirin	112,0	3,6	109,0	3,3	110,6	1,9	110,6	2,0	89,9	98,0
Efavirenz	135,5	19,5	110,6	11,44	122,0	5,5	n/a	n/a	n/a	88,7
Etravirin	92,9	8,2	107,8	10,7	120,3	6,3	128,3	12,6	75,3	86,6
Glekaprevir	128,0	9,1	119,4	12,2	117,5	8,0	95,5	10,1	72,0	84,1
Ledipasvir ²⁺	90,2	6,5	89,7	10,7	88,9	6,1	94,3	6,6	94,6	80,4
Lopinavir	85,2	9,6	67,3	7,9	57,9	3,5	72,2	12,5	106,2	98,8
Maravirok	158,9	8,6	115,4	1,9	112,1	5,6	111,1	7,1	71,6	59,6
Rilpivirin	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Ritonavir	71,0	2,8	70,0	6,4	73,5	8,5	67,8	3,0	101,8	106,2
Saquinavir	83,5	7,15	77,0	17,3	74,9	8,4	79,5	12,3	114,6	113,1
Simeprevir	103,9	3,7	92,5	12,7	114,4	0,8	n/a	n/a	93,1	94,1
Sofosbuvir	108,0	2,3	95,4	2,3	103,1	3,9	102,0	1,2	96,3	105,2
Tenofovir	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	25,5	0,6
Tenofovir alafenamid	100,0	0,0	107,0	2,3	107,4	1,7	99,7	1,7	103,4	102,3
Tenofovir disoproxil	110,0	5,7	112,0	2,2	102,6	4,0	106,2	6,8	100,5	106,2
Tenofovir monoester	113,0	8,7	142,3	12,0	143,1	11,0	185,0	6,3	100,1	103,7
Velpatasvir ²⁺	90,2	12,9	90,2	2,3	86,3	10,1	85,5	14,6	111,5	117,1
Zidovudin	99,6	20,1	157,0	14,5	40,9	73,9	17,5	97,1	58,0	294,9

5.6. Srovnání RP a HILIC metody

V rámci metody HILIC bylo dosaženo separace nižšího počtu látek (16 píků a 7 samostatně separovaných látek) v porovnání s módem RP (21 píků a 19 samostatně separovaných látek). V módu RP bylo zároveň dosaženo lepších tvarů píků (úzké, symetrické nerozmyté píky) pro BIC, DAC, DOR, TEN, ATA a SOF. V módu HILIC bylo dosaženo lepšího tvaru píku pro BOC. Jako vhodnější mód pro separaci látek se tedy ukázal mód reverzně fázový. Na obrázku 45 je rozložení analytů v grafu závislosti retenčních časů v RP a v HILIC pro demonstraci ortogonality a odlišné selektivity vyvinutých metod.

Obrázek 45: Graf závislosti retenčních časů v RP a v HILIC



Další porovnávané parametry byly spodní limit kvantifikace a lineární rozsah. Rovněž byly porovnány korelační koeficienty a RSD směrnic ze 2 měření kalibračních křivek. Pro analyty v tabulce 34 označené zeleně dosáhl vyšší citlivosti, tzn. nižšího LLOQ mód RP, pro bílé řádky – 16 analytů mód HILIC. V případě simepreviru byla omezením pro HILIC linearita – nebylo dosaženo 6 bodů křivky ani při použití kvadratické závislosti. Řešením tohoto problému by mohla být kalibrace v užším rozsahu (přípravení 4 – 5 roztoků na jeden řád kalibrační křivky), případně zavedení značeného vnitřního standardu pro simeprevir. Analyty v tabulce 34 označené červeně dosáhly v módu HILIC lepší citlivosti, avšak nebyl splněn limit lineárního rozsahu. Pro úspěšnou kalibraci by v tomto případě bylo nutné připravit více kalibračních vzorků v užším rozsahu (4 vzorky na 1 koncentrační řád) nebo zavést příslušné značené vnitřní standardy. V případě tenofoviru nebyl požadavek na lineární rozsah splněn ani v RP. RSD směrnic byly v módu RP ve všech případech pod 5 %. V případě HILIC byly pod 5 % u všech analytů kromě zidovudinu, u kterého bylo dosaženo RSD 12,8 %.

Tabulka 34: Souhrn údajů lineární regrese v RP a HILIC.

Analyt	RP				HILIC			
	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient	RSD [%]	LLOQ [ng/mL]	ULOQ [ng/mL]	Korelační koeficient	RSD [%]
Abakavir	0,5	50	0,99804	0,97	0,01	0,5	0,99966	0,26
Atazanavir	0,002	50	0,99976	0,17	0,001	0,5	0,99948	0,36
Biktegravir	0,5	50	0,99965	0,45	0,1	0,5	0,99402	1,06
Boceprevir	0,075	50	0,99981	0,05	0,003	0,5	0,99937	0,21
Daclatasvir	0,5	50	0,99727	2,34	0,015	5	0,99896	0,36
Didanosin	5	500	0,99807	1,49	0,02	5	0,99846	0,04
Doravirin	0,02	50	0,99946	0,04	0,01	0,5	0,99945	0,15
Efavirenz	0,075	50	0,99933	0,72	0,1	0,5	0,99331	2,08
Etravirin	0,2	500	0,99962	0,27	0,1	2	0,99795	1,75
Glekaprevir	0,05	50	0,99957	0,55	0,0125	0,5	0,99516	3,96
Ledipasvir ²⁺	0,1	50	0,99943	0,27	0,005	0,5	0,99793	0,24
Lopinavir	0,0035	50	0,99980	0,11	0,006	0,5	0,99737	1,12
Maravirok	0,075	5	0,99733	2,98	0,0035	0,2	0,99680	0,63
Rilpivirin	0,035	10	0,99802	0,18	0,006	0,5	0,99687	2,13
Ritonavir	0,0075	50	0,99958	0,09	0,001	0,35	0,99862	1,49
Saquinavir	0,0075	50	0,99917	0,34	0,001	0,5	0,99960	0,53
Simeprevir	0,006	50	0,99970	0,08	n/a			
Sofosbuvir	0,01	50	0,99978	0,17	0,001	0,5	0,99880	0,35
Tenofovir	3,5	50	0,99739	3,01	n/a			
Tenofovir alafenamid	0,02	50	0,99983	0,51	0,003	0,5	0,99820	0,67
Tenofovir disoproxil	0,005	50	0,99986	0,54	0,0001	0,5	0,99954	1,37
Tenofovir monoester	0,06	50	0,99961	0,38	0,075	0,5	0,99834	1,20
Velpatasvir ²⁺	0,3	50	0,99817	1,57	0,0075	0,5	0,99687	1,21
Zidovudin	0,5	50	0,99803	0,83	0,0075	0,3	0,99686	12,8

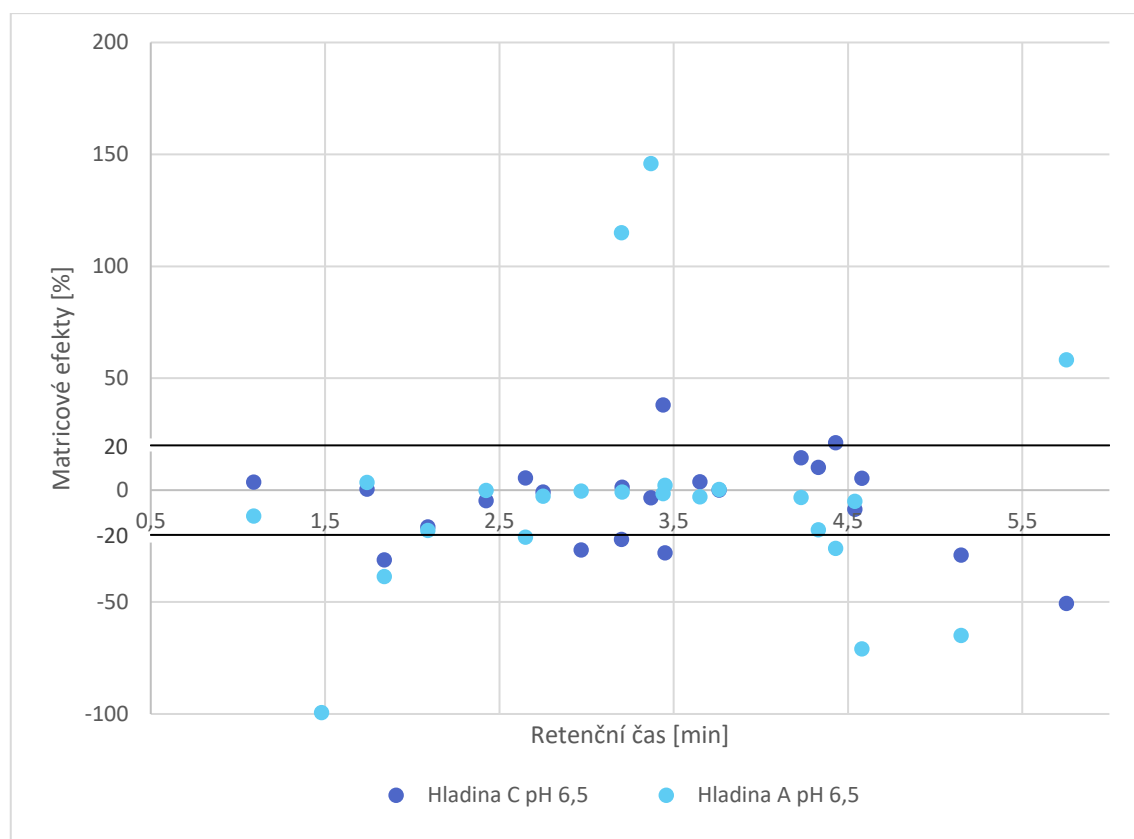
V tabulce 35 jsou srovnány matricové efekty před a po vztahování na vnitřní standard. Modře jsou pro přehlednost označeny odchylky od 100 % větší než 20 %. V případě ABA, SAQ, TEN, ZID je vidět pozitivní vliv zavedení vnitřního standardu na eliminaci matricových efektů. Pro BIC, DID, ETR, GLE, LED²⁺, SIM, MONO a VEL²⁺ by bylo vhodné zavedení jiných značených vnitřních standardů, v ideálním případě individuálních pro daný analyt.

Na obrázku 46 a 47 jsou zobrazeny grafy závislosti matricových efektů na retenčním čase pro HBS média pH 6,5 v RP a HILIC. V módu HILIC se vyskytovali matricové efekty větší než 20 % u 7 analytů, zatímco v módu RP u 12 analytů. V módu HILIC se až na extrémní výjimky (ZID, TEN) projeví nižší matricové efekty ve srovnání s RP.

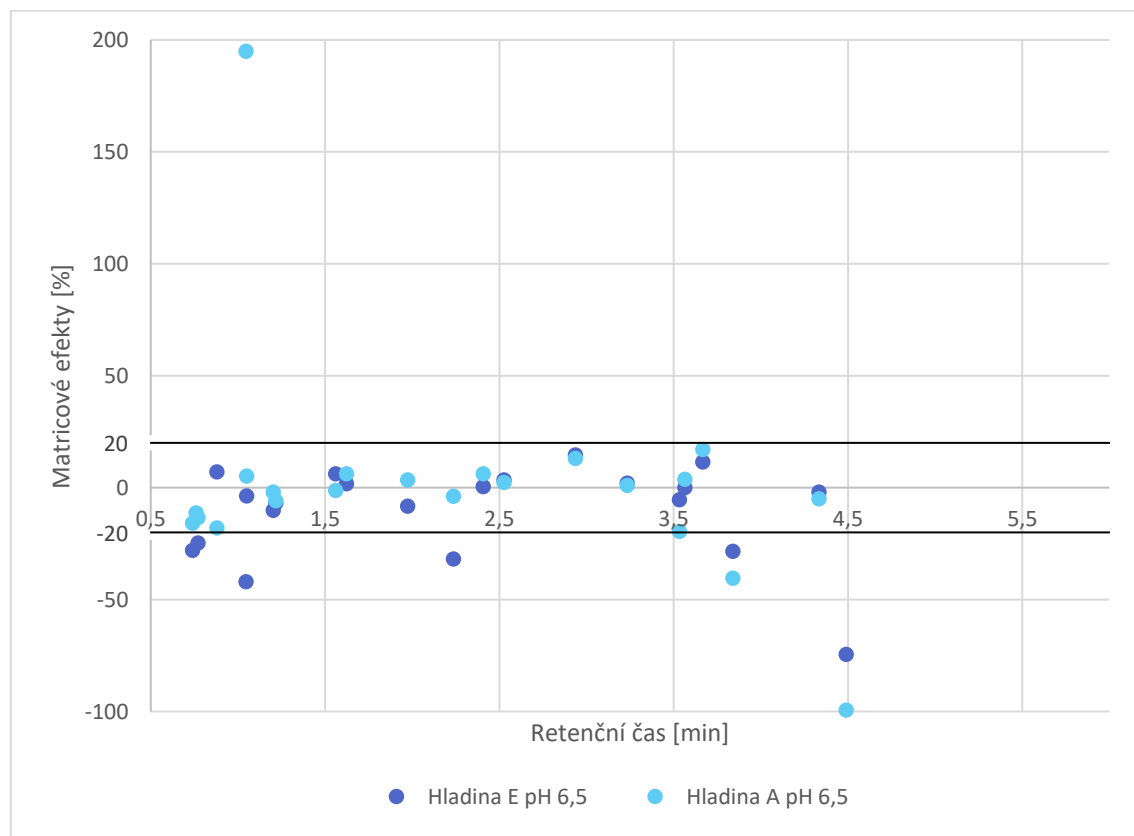
Tabulka 35: Srovnání matricových efektů před a po vzažení na vnitřní standard pro jednotlivá HBS média v RP a HILIC.

Analyt	HBS médium pH 6,5 v RP				HBS médium pH 7,4 RP				HBS médium pH 6,5 HILIC			
	Hladina C vztažena na IS	Hladina C bez IS	Hladina A vztažena na IS	Hladina A bez IS	Hladina C vztažena na IS	Hladina C bez IS	Hladina A vztažena na IS	Hladina A bez IS	Hladina E vztažena na IS	Hladina E bez IS	Hladina A vztažena na IS	Hladina A bez IS
Abakavir	100,4	126,7	103,4	165,1	100,3	126,9	102,7	161,2	102,0	100,4	101,0	103,9
Atazanavir	100,0	92,5	100,3	97,4	98,5	97,5	100,6	99,6	91,8	87,7	103,4	100,6
Biktegravir	138,0	123,1	98,4	94,9	147,5	139,6	106,7	105,0	n/a	n/a	n/a	n/a
Boceprevir	114,4	105,9	96,7	94,0	101,9	100,8	96,4	95,5	107,0	93,4	82,0	87,6
Daclatasvir	95,3	88,5	99,8	96,5	86,2	89,7	94,3	93,8	98,1	100,6	95,0	99,1
Didanosin	n/a	n/a	0,6	1,0	n/a	n/a	0,5	0,8	68,1	71,6	96,2	98,1
Doravirin	103,7	95,9	97,0	94,2	98,0	97,0	102,0	101,0	89,9	81,7	98,0	91,8
Efavirenz	91,4	84,5	94,9	92,2	85,4	84,5	111,2	110,1	n/a	n/a	88,7	101,2
Etravirin	105,3	97,4	29,0	28,1	97,0	96,0	58,8	58,3	75,3	74,6	86,6	90,6
Glekaprevir	70,9	65,6	35,0	34,0	58,2	57,6	35,4	35,1	72,0	78,8	84,1	87,1
Ledipasvir ²⁺	96,5	86,1	245,8	237,2	106,5	100,8	243,3	239,3	94,6	72,5	80,4	76,3
Lopinavir	121,2	112,1	74,0	71,9	111,4	110,2	71,2	70,5	106,2	96,0	98,8	106,7
Maravirok	105,4	97,8	78,9	76,3	107,4	111,7	74,9	74,5	71,6	69,5	59,6	61,6
Rilpivirin	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Ritonavir	110,1	101,9	82,2	79,9	110,3	109,1	86,6	85,8	101,8	92,8	106,2	105,2
Saquinavir	72,0	64,3	102,1	98,5	80,6	76,3	90,9	89,4	114,6	88,5	113,1	104,2
Simeprevir	49,4	45,7	158,2	153,8	34,8	34,4	100,2	99,3	93,1	90,2	94,1	96,8
Sofosbuvir	101,3	90,4	99,1	95,7	102,2	96,7	99,0	97,4	96,3	80,4	105,2	96,0
Tenofovir	103,6	130,7	88,4	141,1	109,4	138,4	90,2	141,7	25,5	21,6	0,6	1,6
Tenofovir alafenamid	99,1	92,0	97,2	94,0	97,6	101,5	97,8	97,3	103,4	105,9	102,3	105,8
Tenofovir disoproxil	73,3	68,0	99,5	96,2	79,0	82,2	86,6	86,1	100,5	100,6	106,2	106,9
Tenofovir monoester	68,8	86,8	61,3	97,9	76,8	97,1	68,9	108,2	100,1	91,4	103,7	100,6
Velpatasvir ²⁺	77,9	72,3	215,0	207,8	85,4	88,8	212,0	210,9	111,5	92,3	117,1	100,3
Zidovudin	83,5	77,5	82,0	79,2	83,5	86,8	84,6	84,2	58,0	76,1	294,9	177,1

Obrázek 46: Závislost matricových efektů na retenčním čase pro HBS médium pH 6,5 v módu RP



Obrázek 47: Závislost matricových efektů na retenčním čase pro HBS médium pH 6,5 v módu HILIC



6. Závěr

Byly vyvinuty nové UHPLC-MS/MS analytické metody pro vybranou skupinu antivirotik. Dle stanovených cílů byly chromatografické podmínky (v módu RP i HILIC) i hmotnostně spektrometrická metoda optimalizovány za účelem dosažení co nejvyšší citlivosti, selektivity, rozlišení a symetrie chromatografických píků.

V módu RP bylo dosaženo nejlepší separace na koloně BEH Shield RP18. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla v tomto zvolena 10 mM kyselina mravenčí s ACN s přídavkem 0,1 % kyseliny medronové do obou složek MF pro zabezpečení symetrického tvaru píku tenofoviru. Byla použita gradientová eluce 5 % – 98 % ACN do 5. minuty. Separace se uskutečňovala při teplotě 40 °C a průtoku 0,3 mL/min. Optimalizované složení rozpouštědla vzorku byl 20 % ACN ve vodě. Za těchto podmínek eluovaly všechny analyty a byla úspěšně změřena kalibrační křivka pro porovnání s HILIC.

V módu HILIC bylo nejlepší separace dosaženo na koloně Ascentis Express HILIC v kombinaci s mobilní fází skládající se z 25 mM mravenčanu amonného o pH 3 s přídavkem 0,1 % kyseliny medronové a ACN s přídavkem 0,1 % kyseliny medronové. Byla provedena gradientová eluce od 98 % ACN do 50 % ACN během 5 minut. Separace se odehrávala při 40 °C a průtoku 0,3 mL/min. Optimalizované rozpouštědlo vzorku byl 100 % ACN. Za těchto podmínek eluovaly všechny analyty a kalibrace byla úspěšně změřena pro všechny látky s výjimkou simepreviru, jehož kalibrace nebyla lineární ani kvadratická. Pro simeprevir je tedy nutná další optimalizace – měření kalibrační křivky s více (4 – 5) vzorky na 1 řád kalibrace.

Nakonec byla vyvinuta a optimalizována metoda pro extrakce cílových antivirotik z HBS média – pufru o pH 6,5 a pufru o pH 7,4. Jako nejvhodnější se pro μ -SPE-PT ukázala kombinace 2 vrstev sorbentu AX a 2 vrstev sorbentu C18. Činidlem zvoleným pro promytí byl 5 mM amoniak ve vodě a činidlem pro eluci 25 mM kyselina mravenčí v 90 % ACN. Následně byla metoda doplněna o krok odpaření extrakčního činidla a rekonstituce vzorku příslušným rozpouštědlem – 20 % ACN ve vodě pro RP a 100 % ACN pro HILIC. S takto optimalizovanou extrakční metodou byly měřeny matricové kalibrační křivky. V módu RP se nepodařilo v médiu o pH 7,4 kvantifikovat pouze tenofovir kvůli příliš silné vazbě na AX sorbent a problematické nerobustní eluci. Je u něj tedy nutná další optimalizace. Cestou pro zvýšení eluce by pravděpodobně byl vyšší přídavek kyseliny mravenčí, případně přídavek silnější kyseliny – například kyseliny trifluoroctové. Ten by však měl v případě multimetody negativní vliv na odezvy dalších analytů. Nabízí se tedy řešení s vývojem a optimalizací samostatné metody pro extrakci a kvantifikaci tenofoviru. V módu HILIC se nepodařilo kvantifikovat v médiu o pH 6,5 tenofovir a rilpivirin, v médiu o pH 7,4 pak tenofovir, zidovudin, rilpivirin a biktégravir. V tomto případě jsou pravděpodobně na vině matricové efekty (krom tenofoviru – problémy extrakce). Řešením tohoto problému by bylo zavedení vlastní značené IS pro zmíněné analyty.

Byl proveden pokus o validaci vyvinutých metod. V módu RP byla validace metody úspěšná pro 11 analytů v HBS médiu o pH 6,5 a pro 13 analytů v HBS médiu o pH 7,4. V HBS médiu o pH 7,4 i 6,5 je tedy možná analýza pomocí RP-UHPLC-MS/MS pro 9 analytů, v médiu o pH 6,5 je tato možnost rozšířena o další 2 analyty a v médiu o pH 7,4 pak o další 4. Pro 15 analytů je nutné provedení nové validace metody v obou, či pouze jednom HBS médiu. Podmínky této validace mohou být upraveny na základě výsledků provedeného pokusu o validaci. V případě HILIC byla z časových důvodů validována pouze metoda pro analýzu vzorků média o pH 6,5 a validace byla úspěšná pro 9 analytů. Mód HILIC rozšiřuje spektrum možných analytů o další 3 látky v HBS médiu o pH 6,5. Pro mód HILIC je nutné provedení validace v HBS

médiu o pH 7,4, v HBS médiu o pH 6,5 je nutné zopakování validace pro 15 analytů. Podmínky validace v médiu o pH 6,5 mohou být upraveny na základě výsledků provedeného pokusu o validaci.

Byly porovnány chromatografické módy RP a HILIC. Pro 19 analytů dosáhl vyšší citlivosti mód HILIC. Pro zbylých 5 analytů (EFA, LOP, SIM, TEN, MONO) byl z důvodu citlivosti módem volby RP. Lepší separace bylo dosaženo v módu RP, kde bylo separováno 21 píků – z nich 19 píků samostatných látek a zbylé 2 píky byly koeluce. V módu HILIC bylo separováno 16 píků z nichž 7 píků byly samostatně separované látky a zbylých 9 píků koeluce. V rámci chromatografické metody bylo lepší separace dosaženo v módu RP.

Pro analyty, pro které byla validace metod úspěšná, mohou metody sloužit k pochopení transportních mechanismů antivirotek přes biologické membrány a jejich ovlivnění přítomností dalšího z cílových úspěšně validovaných antivirotek. Pro analyty, u kterých se metodu úspěšně validovat nepodařilo, jsou poznatky z vývoje metod zdrojem informací pro optimalizaci individuálně zaměřených metod.

7. Seznam použité literatury

- [1] J. Klimeš, Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2015.
- [2] R. Karlíček, Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2007.
- [3] L. Nováková, D. Solichová, P. Solich, Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2433–2443. doi:10.1002/jssc.200600147.
- [4] L. Nováková, M. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Lucie Nováková, Praha [i.e. Hradec Králové], 2013.
- [5] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta.* 656 (2009) 8–35. doi:10.1016/J.ACA.2009.10.004.
- [6] S. Fekete, J. Schappler, J.-L. Veuthey, Current and future trends in UHPLC, *TrAC Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 2–13. doi:10.1016/J.TRAC.2014.08.007.
- [7] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 105–119. doi:10.1016/J.JPBA.2013.03.012.
- [8] ACQUITY UPLC Columns, (n.d.). http://www.waters.com/waters/en_CZ/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=en_CZ&cid=513206 (online 7. 3. 2019).
- [9] E.S. Grumbach, K.J. Fountain, Comprehensive Guide to HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography, Waters, Milford, MA, 2010.
- [10] CORTECS Columns, (2015). http://www.waters.com/waters/en_CZ/Solid-Core-Particle-Columns/nav.htm?locale=en_CZ&cid=134740934 (online 7. 3. 2019).
- [11] J. Ruta, D. Zurlino, C. Grivel, S. Heinisch, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest, *J. Chromatogr. A.* 1228 (2012) 221–231. doi:10.1016/J.CHROMA.2011.09.013.
- [12] Ministerstvo zdravotnictví ČR, Český lékopis 2017, Grada Publishing, Praha, 2017.
- [13] L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich, Comparison of performance of C18 monolithic rod columns and conventional C18 particle-packed columns in liquid chromatographic determination of Estrogel and Ketoprofen gel, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 813 (2004) 191–197. doi:10.1016/j.jchromb.2004.09.045.
- [14] A. Svoboda, Optimalizace HPLC separace bazických látek ze skupiny betablokátorů - využití nových typů stacionárních fází, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011. https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/101269/37097833/?q=%7B%22____searchform____search%22%3A%22lucie+nov%5Cu00e1kov%5Cu00e1%22%2C%22____searchform____butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22PNzzpSearchListbasic%22%3A%221%22%7D&lang=cs.
- [15] Exceed Expectations - ACQUITY UPLC Columns, (2015). <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf> (online 7. 6. 2019).

- [16] D. V. McCalley, A study of column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography, J. Chromatogr. A. 1554 (2018) 61–70. doi:10.1016/J.CHROMA.2018.04.016.
- [17] A. Kumar, J.C. Heaton, D. V. McCalley, Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography, J. Chromatogr. A. 1276 (2013) 33–46. doi:10.1016/J.CHROMA.2012.12.037.
- [18] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, Anal. Chim. Acta. 692 (2011) 1–25. doi:10.1016/J.ACA.2011.02.047.
- [19] D. V. McCalley, Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1523 (2017) 49–71. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.06.026.
- [20] Improve productivity with modern UHPLC column technology, (2016). <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005428en.pdf> (online 23. 6. 2019).
- [21] Ascentis® Express UHPLC and HPLC Columns, (2015). https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/t407044.pdf (online 23. 6. 2019)
- [22] Ascentis® Express OH5 Column Care & Use Sheet, (2012). <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Datasheet/1/T712115.pdf> (online 23. 6. 2019).
- [23] Ascentis® Express HILIC Column Care & Use Sheet, (2008). <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Datasheet/1/T708005.pdf> (online 23. 6. 2019).
- [24] HILIC Stationary Phases, (2019). <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hilic-hplc-uhplc-columns-information/hilic-overview/hilic-stationary-phases.html> (online 17. 8. 2019).
- [25] Thermo Scientific™ Synchronis™ HILIC LC Columns, (2019). <https://www.fishersci.no/shop/products/synchronis-hilic-columns-5-m/p-4523090> (online 17. 8. 2019).
- [26] Thermo Scientific™ Synchronis™ HILIC LC Columns, (2019). <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/synchronis-hilic-columns-5-m/12375683> (online 17. 8. 2019).
- [27] Thermo Scientific HILIC Separations Technical Guide, (2014). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf> (online 23. 6. 2019).
- [28] Thermo Scientific Synchronis HILIC HPLC Columns, (2012). http://apps.thermoscientific.com/media/cmd/Synchronis/PS-LC-Synchronis-HILIC-Column-PS20495_E.pdf (online 23. 6. 2019).
- [29] Kinetex HPLC/UHPLC Columns Tips for Care and Use, (2017). <https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/kinetex-hplc-uhplc-columns-tips-for-care-and-use.pdf> (online 29. 6. 2019).
- [30] Better UHPLC Performance Starts NOW, (2011).

- <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/ef8950ec-aa2c-4c78-919b-18e3c432b638.pdf> (online 23. 6. 2019).
- [31] Luna HPLC/UHPLC Columns Tips for Care and Use, (2008). <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/ed46ffbc-b77a-4b5f-9077-c0731361e2ec.pdf> (online 23. 6. 2019).
 - [32] explore LUNA HILIC, (2007). https://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/5388_Luna_Hilic_brochure.pdf?PHPSESSID=85af5fbbbe0c3363807423e5c8a4d017 (online 23. 6. 2019).
 - [33] Zorbax Eclipse PAH Brochure, (n.d.). https://www.chromtech.com/Content/Images/uploaded/PDFs/agilent_zorbax_eclipse_pah_hilic_plus_nh2.pdf (online 23. 6. 2019).
 - [34] Agilent ZORBAX HILIC Plus HPLC Columns Data Sheet, (2009). <https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/820114-001.pdf> (online 23. 6. 2019).
 - [35] Zorbax HILIC Plus, (2019). <https://www.chromtech.com/zorbax-hilic-plus> (online 17. 8. 2019).
 - [36] Continuing the Legacy of HPLC Column Performance, (2014). <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003995en.pdf> (online 29. 6. 2019).
 - [37] The Only Columns You Will Ever Need!, (2014). <http://interactivepdf.uniflip.com/2/41719/305739/pub/document.pdf> (online 23. 6. 2019).
 - [38] Agilent ZORBAX HILIC Plus Column Specifications and Options, (2019). <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005942> (online 22. 8. 2019).
 - [39] Sweet Sugar Separations Are in Your Future, (2018). <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/c5307b71-fdb1-48b6-900a-636b2d6f7756.pdf> (online 23. 6. 2019).
 - [40] C. Sanchez, M.M. Kansal, A. Dixon, P.J. Koerner, T. Mathews, Increasing LC-MS/MS Sensitivity with Luna HILIC, (2007). <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/2661ef62-9ac3-4d31-a856-e072c90210fb.pdf> (online 15. 3. 2020).
 - [41] R.E. Ardrey, Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction, John Wiley & Sons, New York, 2003.
 - [42] L. Nováková, M. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., Lucie Nováková, Praha [i.e. Hradec Králové], 2013. 978-80-260-4244-0.
 - [43] M.C. McMaster, LC/MS: a practical user's guide, John Wiley & Sons, Hoboken, 2005.
 - [44] E. de Hoffmann, Stroobant Vincent, Mass spectrometry: principles and applications, 3rd ed., John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
 - [45] J.H. Gross, Mass spectrometry: a textbook, 2nd ed., Springer, Heidelberg, 2011. doi:10.1007/978-3-642-10711-5.

- [46] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Qual. Guid. (2005). https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (online 13. 3. 2019).
- [47] Guideline on bioanalytical method validation, (2011). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (online 5. 5. 2020).
- [48] L. Nováková, J. Pavlík, L. Chrenková, O. Martinec, L. Červený, Current antiviral drugs and their analysis in biological materials—Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 400–416. doi:10.1016/J.JPBA.2017.06.071.
- [49] J. Martínková, *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 2. vydání, Grada Publishing, Praha, 2018.
- [50] J. Švihovec, J. Bultas, P. Anzenbacher, J. Chládek, J. Příborský, J. Slíva, M. Votava, *Farmakologie*, Grada Publishing, Praha, 2018.
- [51] Viry, (n.d.). http://www.gymh.cz/vyuka/biologie/prehledy/1uvo_5_viry.pdf (online 23. 3. 2019).
- [52] L. Nováková, J. Pavlík, L. Chrenková, O. Martinec, L. Červený, Current antiviral drugs and their analysis in biological materials – Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 378–399. doi:10.1016/J.JPBA.2017.07.003.
- [53] J. Slíva, M. Votava, *Farmakologie*, Triton, Praha, 2011.
- [54] Scifinder, (n.d.). <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (online 13. 3. 2019).
- [55] Chemicalize, (2019). <https://chemicalize.com/#/> (online 12. 3. 2019).
- [56] Evropská rada, *European Pharmacopoeia 9.7*, 9th ed., Strasbourg, 2018.
- [57] ALSACHIM a Shimadzu Group Company, (n.d.). <https://www.alsachim.com> (online 14. 3. 2019).
- [58] MedKoo Biosciences, Inc., (n.d.). <https://medkoo.com> (online 21. 3. 2019).
- [59] Toronto Research Chemicals, (n.d.). <https://www.trc-canada.com> (online 21. 3. 2019).
- [60] M. Safari, M. Shamsipur, P. Zohrabi, H. Ebrahimzadeh, Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction/HPLC-UV as a sensitive and efficient method for extraction, pre-concentration and simultaneous determination of antiretroviral drugs nevirapine, efavirenz and nelfinavir in pharmaceutical formulations and biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 166 (2019) 95–104. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.003>.
- [61] E. dos Santos Martins, J.A. Oliveira, T.B. Franchin, B.C.U. Silva, C.D. Cândido, R.G. Peccinini, Simple and Rapid Method by Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) with Ultraviolet Detection for Determination of Efavirenz in Plasma: Application in a Preclinical Pharmacokinetic Study, *J. Chromatogr. Sci.* 57 (2019) 874–880. doi:10.1093/chromsci/bmz078.
- [62] D. Ferrari, S. Bagaglio, M. Raso, L. Galli, S. Premaschi, E. Messina, G. Morsica, M. Locatelli, C. Uberti-Foppa, H. Hasson, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of simeprevir, daclatasvir, sofosbuvir, and GS-331007 applied to a retrospective clinical pharmacological study, *J. Chromatogr. B.* 1120

(2019) 1–7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.048>.

- [63] M. van Seyen, M.J.A. de Graaff Teulen, N.P. van Erp, D.M. Burger, Quantification of second generation direct-acting antivirals daclatasvir, elbasvir, grazoprevir, ledipasvir, simeprevir, sofosbuvir and velpatasvir in human plasma by UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 1110–1111 (2019) 15–24. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.024>.
- [64] A.A. Youssef, N. Magdy, L.A. Hussein, A.M. El-Kosasy, Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Ribavirin, Sofosbuvir and Daclatasvir in Human Plasma: A Treatment Protocol Administered to HCV Patients in Egypt, *J. Chromatogr. Sci.* 57 (2019) 636–643. doi:10.1093/chromsci/bmz038.
- [65] L. Zhao, Z. Li, Z. Zhou, X. Kang, B. Fang, H. Ma, Q. Ge, Simultaneous determination of tenofovir alafenamide and tenofovir in human plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetics study in clinic, *J. Chromatogr. B.* 1117 (2019) 148–157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.011>.
- [66] P.K. Prathipati, S. Mandal, C.J. Destache, Development and validation of LC–MS/MS method for quantification of bictegravir in human plasma and its application to an intracellular uptake study, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019) e4379. doi:10.1002/bmc.4379.
- [67] S.H. Patel, O.A. Ismaiel, W.R. Mylott, M. Yuan, K.F. Hauser, M. McRae, Simultaneous determination of intracellular concentrations of tenofovir, emtricitabine, and dolutegravir in human brain microvascular endothelial cells using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Anal. Chim. Acta.* 1056 (2019) 79–87. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.015>.
- [68] A.J. Ocque, C.E. Hagler, G.D. Morse, S.L. Letendre, Q. Ma, Development and validation of an LC–MS/MS assay for tenofovir and tenofovir alafenamide in human plasma and cerebrospinal fluid, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 156 (2018) 163–169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.035>.
- [69] Y. Wu, J. Yang, C. Duan, L. Chu, S. Chen, S. Qiao, X. Li, H. Deng, Simultaneous determination of antiretroviral drugs in human hair with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1083 (2018) 209–221. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.021>.
- [70] A.P. Schauer, C. Sykes, M.L. Cottrell, H. Prince, A.D.M. Kashuba, Validation of an LC–MS/MS assay to simultaneously monitor the intracellular active metabolites of tenofovir, emtricitabine, and lamivudine in dried blood spots, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149 (2018) 40–45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.030>.
- [71] M. Conti, T. Matulli Cavedagna, E. Ramazzotti, R. Mancini, L. Calza, M. Rinaldi, L. Badia, V. Guardigni, P. Viale, G. Verucchi, Multiplexed therapeutic drug monitoring (TDM) of antiviral drugs by LC–MS/MS, *Clin. Mass Spectrom.* 7 (2018) 6–17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinms.2017.12.002>.
- [72] Web of Science, (n.d.). <http://webofknowledge.com/WOS> (online 23. 3. 2019).
- [73] AISLP, (2018). <https://www.aislp.cz/>.
- [74] J.J. Hsiao, O.G. Potter, T.-W. Chu, H. Yin, Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive, *Anal. Chem.* 90 (2018) 9457–9464. doi:10.1021/acs.analchem.8b02100.